

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. März 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/022881 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/21,
A61K 39/104

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/03393

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. September 2002 (12.09.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 45 042.7 13. September 2001 (13.09.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER
[DE/DE]; Carl-Neuberg-Str. 1, 30623 Hannover (DE).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: TÜMLER, Burkhard [DE/DE]; Kirchröder
Str. 8, 30625 Hannover (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WIEHLMANN,
Lutz [DE/DE]; Pelikanstr. 14, 30177 Hannover (DE).
KIEWITZ, Claudia [DE/DE]; Gartenweg 16, 79594
Inzlingen (DE). LARBIG, Karen [DE/DE]; Armimstr.
4, 30625 Hannover (DE). RITZKA, Margit [DE/DE];
Hartmannstr. 4, 30171 Hannover (DE).

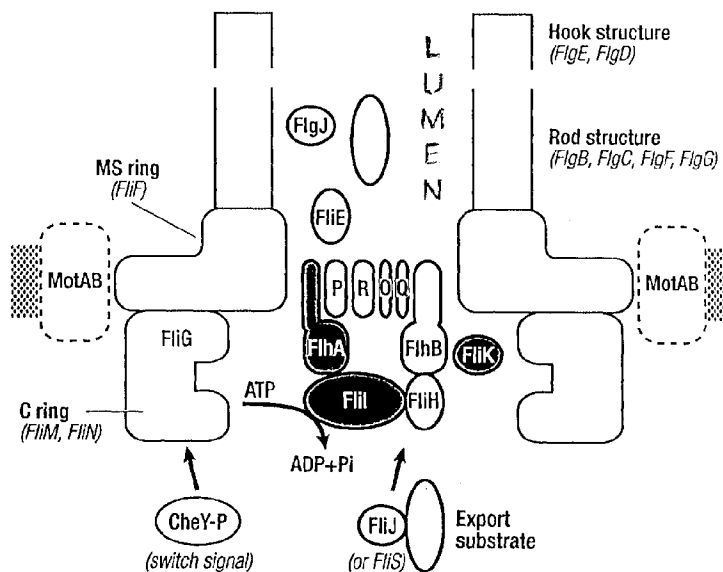
(74) Anwalt: LÄUFER, Martina; Gramm, Lins & Partner
GBR, Freundallee 13, 30173 Hannover (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PHENOTYPE-DETERMINING VIRULENCE GENES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* FOR COLONIZATION AND PERSISTENCE IN HUMAN BEINGS, ANIMALS AND PLANTS, USES OF SAID GENE AND ASSOCIATED PROTEINS

(54) Bezeichnung: PHÄNOTYP BESTIMMENDE VIRULENZGENE VON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ZUR KOLONISATION UND PERSISTENZ IN MENSCH, TIER UND PFLANZE, VERWENDUNGEN DER GENE UND ZUGEHÖRIGEN PROTEINE



(57) Abstract: The invention relates to the genes of the microorganism *Pseudomonas aeruginosa* which when switched off reduce the virulence of said microorganism and even make said microorganism completely innocuous. The genes which are known to determine virulence are used as targets for the development of medicaments and vaccines for blocking or switching off said genes or the associated gene products *in vivo*, in addition to the development of diagnostic agents.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/022881 A2



CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für alle Bestimmungsstaaten
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Es werden Gene des Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben, deren ausschalten eine Beeinträchtigung der Virulenz bis hin zur völligen Unschädlichmachung des Mikroorganismus bewirkt. Die als virulenzbestimmend erkannten Gene werden als Targents für die Entwicklung von Arzneimitteln und Impfstoffen zur Blockierung oder Ausschaltung dieser Gene oder der zugehörigen Genprodukte in vivo, sowie für die Entwicklung von Diagnostika vorgeschlagen.

Phänotyp bestimmende Virulenzgene von *Pseudomonas aeruginosa* zur Kolonisation und Persistenz in Mensch, Tier und Pflanze, Verwendungen der Gene und zugehörigen Proteine

- 5 Die Erfindung betrifft neu identifizierte Sequenzen des Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*, Verwendungen dieser neuen und bekannten Sequenzen des o.g. Mikroorganismus sowie zugehörige Antikörper und Vakzine.

10 In der Gattung *Pseudomonas* sind stäbchenförmige, polar begeißelte, gram-negative Bakterien zusammengefaßt. Bei der Art *Pseudomonas aeruginosa* (aerugo, lat. = Grünspan) handelt es sich um Bakterien der Länge 1,5 - 3 µm und des Durchmessers 0,5 - 0,8 µm, die der Gruppe der γ-Proteobakterien zugeordnet werden und um einen relativ häufig vorkommenden, gut untersuchten und vollständig sequenzierten Mikroorganismus. Die taxonomische Einteilung erfolgt auf
15 der Grundlage der 16S- rRNA Sequenzen. *P.aeruginosa* zeichnet sich durch die Produktion verschiedener Farbstoffe aus, die zu der Namensgebung des Bakteriums geführt haben.

P.aeruginosa stellt nur sehr geringe Anforderungen an den Lebensraum und ist
20 durch selektive Regulation seiner Genexpression in der Lage, sich an ein breites Spektrum unterschiedlicher Umweltbedingungen anzupassen. Er wurde sogar in fast reinem Wasser (>71 kΩ und in einigen Desinfektionsmitteln nachgewiesen. Diese große Anpassungsfähigkeit macht *P.aeruginosa* zu einem fast ubiquitären und teilweise gefährlichen Keim, der nur gegen Austrocknung sehr empfindlich ist.
25 Durch selektive Regulation der Genexpression kann der Phänotyp der Bakterien je nach Anforderungen des Habitates zwischen einer mukoiden und einer nicht-mukoiden Variante variieren.

In der nicht- mukösen Form ist das Bakterium begeißelt und mit einer vielfältigen
30 Oberfläche ausgestattet, so daß es neue Lebensräume erschließen kann. Muköse *P.aeruginosa* sind unbegeißelt und unterscheiden sich in vielen phänotypischen Merkmalen von der beweglichen Variante. Der auffälligste Unterschied ist dabei die starke Produktion an Alginat. Vermutlich wird durch diese Glykokalyx die stabile

Anheftung der Bakterien an Oberflächen vermittelt und so der Halt der Kolonie gegen Gewässerströmungen oder Zilienbewegungen eines besiedelten Epithels gesichert. Weiterhin wird eine Phagozytose erschwert und die Nährstoffaufnahme erleichtert (BOTZENHARDT & DÖRING 1993; COSTERTON ET AL. 1987)

5

Genetische Untersuchungen haben gezeigt, daß die zu einer Stoffwechselkette gehörenden Gene in *P.aeruginosa* PAO meistens nicht in einer polycistronischen Genkassette liegen, von einem gemeinsamen Promotor reguliert und, wie z.B. bei *Escherichia coli*, als eine mRNA transkribiert werden, sondern trotz einer
10 gemeinsamen Regulation an verschiedenen Stellen des Genoms kodiert sind. Die Untersuchung des PAO- Genoms zeigte eine schon von *P.putida* bekannte Zweiteilung: Essentielle und anabole Gene liegen meistens in der Nähe des Replikationsursprungs, katabole und nicht- essentielle zumeist in der anderen Hälfte. Diese Aufteilung ist vermutlich auf die Integration neuer genetischer
15 Elemente, z.B. Plasmide, in ein ehemals kleineres Genom zurückzuführen. Im Jahre 2000 wurde die gesamte genomische Sequenz von *P.aeruginosa* PAO veröffentlicht und ist jetzt für weitere *in silico*- Untersuchungen zugänglich (www.pseudomonas.com).

20 Es besteht eine große genetische Ähnlichkeit von Stämmen aus sehr unterschiedlichen Habitaten, die entweder über eine evolutionär sehr junge Radiation oder eine im Prinzip vom Lebensraum unabhängig konservierte Genomorganisation zu erklären ist. Bei Untersuchung von Isolaten aus *P.aeruginosa* - infizierten CF- Patienten ließ sich neben einer Akquisition aus der
25 Umwelt oft eine nosokomiale Infektion innerhalb einer Klinik oder eine Ansteckung von ebenfalls erkrankten Angehörigen nachweisen

P.aeruginosa befällt allerdings Menschen erst dann, wenn deren Immunsystem allgemein oder lokal geschwächt ist. Frühgeborene und Immunsupprimierte sowie
30 Personen, die an Erkrankungen wie Zystische Fibrose (CF), schweren Verbrennungen oder Malignomen leiden, sind die am meisten befallenen Patientengruppen. Aufgrund seiner Anpassungsfähigkeit, seiner hohen Antibiotikaresistenz und seinen geringen Nährstoffanforderungen ist *P.aeruginosa*

auch in Krankenhäusern zu finden, wo er nach Daten des *National Nosocomial Infections Surveillance System* (USA) mit einem Anteil von 10,1% einer der hauptsächlichen Erreger nosokomialer Erkrankungen ist (BRAVENY , KRUMPSCHMIDT 1985; POLLAK 1985; HORAN 1986).

5

Während der Besiedelung des Gewebes und der Invasion in Epithelzellen produziert *P.aeruginosa* eine Vielzahl von Virulenzdeterminanten. Dazu gehören unter anderem zwei toxische Proteine, Exotoxin A und Exoenzym S, die nach Aufnahme in eukaryontische Zellen deren Zelltod auslösen. Verschiedene Proteasen (Elastase, alkalische Protease, LasA- Fragment) zerstören lokal die Gewebsstruktur im Wirt und hydrolysieren Immunglobuline, Komponenten des Komplementsystems und Rezeptoren der immunkompetenten Zellen. Zusätzlich sezerniert *P.aeruginosa* auch hitzestabile Cytotoxine mit Detergenz- ähnlichen Eigenschaften, sog. Rhamnolipide, die aufgrund ihrer chemischen Struktur weder von Proteasen des Wirtes zersetzt werden können noch eine Immunantwort induzieren. Ein Großteil der Expression der Pathogenitätsfaktoren von *P.aeruginosa* wird wachstumsabhängig über das Quorum Sensing reguliert (DEKIEVIT & IGLEWSKI 2000; STOREY ET AL. 1998).

Im Gegensatz zu der oben beschriebenen akuten Infektion bleibt der chronische *Pseudomonas*- Befall bei CF- Patienten auf die Lunge beschränkt, ist dort aber ein entscheidender Faktor für den Krankheitsverlauf. Durch Alginat und Mucin können schließlich ganze Bereiche der Lunge verschlossen werden, wodurch es in den so entstehenden Atelektasen zu einem irreversiblen Umbau des Lungengewebes kommt. Die für Respiration zur Verfügung stehende Fläche wird dadurch zunehmend kleiner und die Patienten sterben an einer pulmonalen Insuffizienz (PIER 1985; HØIBY 1986).

Es besteht daher ein großes Bedürfnis, Therapeutika und Impfstoffe gegen pathogene *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme zu gewinnen, sowie Diagnostika, mit denen die Pathogenität im Einzelnen festgestellt werden kann.

30

Ziel einer Immunisierung muss eine Immunantwort sein, der die Bakterien nicht durch Veränderung ihrer Oberflächenproteine, wie sie es z.B. bei der Ausbildung eines Biofilms oder in der Lunge von Mukoviszidose-Patienten tun, entkommen können. Ist dies nämlich möglich, wäre die Impfstrategie nicht sinnvoll, da sie nicht zur Eliminierung der Bakterien, sondern nur zu einer Selektion einer bestimmten Bakteriengruppe führen würde.

Für eine erfolgreiche Impfung muss daher sichergestellt sein, dass die in den Organismus eindringenden Pathogene auf das entsprechende Oberflächenprotein nicht einfach verzichten können, oder es während eines Teils ihres Entwicklungszyklus gar nicht exprimieren. Dieses Problem wurde bei den bisherigen Impfstoffen gegen Bakterien nicht immer zur völligen Zufriedenheit gelöst. Während die meisten Viren nicht zu starken Veränderungen in ihrer Proteinzusammensetzung fähig sind und Impfungen gegen eines oder mehrere ihrer Oberflächenproteine fast immer zu einem ausreichenden Impfschutz führen, sind Bakterien Organismen, die sich an gegebene Umweltreize anpassen. Die Entwicklung von Impfstoffen gegen Bakterien ist daher sehr schwierig, da ohne Funktionsvorhersage nicht sicher nachweisbar ist, ob ein spezielles Oberflächenprotein für eine Infektion unverzichtbar ist oder nicht.

Eine Aufgabe der Erfindung besteht daher darin, Mittel zur Verfügung zu stellen, um *Pseudomonas aeruginosa* - Stämme hinsichtlich ihrer Virulenzfaktoren zu klassifizieren und in ihrem Gefahrenpotential beeinflussen zu können. Spezieller besteht die Aufgabe darin, eine Strategie gegen *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen zu entwickeln und mögliche Targets für die Impfstoff-, Therapeutika- und Diagnostika-Entwicklung zu finden.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, dass verschiedene untereinander sehr unterschiedliche Gene über ihre Genprodukte am Virulenzpotential der *Pseudomonas aeruginosa* Mikroorganismen beteiligt sind und voneinander unabhängige, sich jedoch teilweise ergänzende und potenzierende Virulenzfaktoren darstellen. Die im Rahmen dieser Erfindung gefundenen Gene haben zum Teil völlig unterschiedliche Funktionen und sind auch an völlig verschiedenen Stellen im Genom des Mikroorganismus lokalisiert. Ihr Einfluss auf die Virulenz war nicht voraussehbar. Ein „Aus-

schalten“ eines oder mehrerer dieser Gene bewirkt eine Beeinträchtigung der Virulenz bis hin zur völligen Unschädlichmachung des Mikroorganismus.

Die Lösung der Aufgabe dieser Erfindung umfasst:

5

- das Auffinden neuer virulenzbestimmender Gene in *Pseudomonas aeruginosa*;
- die Verwendung neuer und bekannter Gene, die als virulenzbestimmend erkannt wurden, als Targets für die Entwicklung von Arzneimitteln und Impfstoffen zur Blockierung oder Ausschaltung dieser Gene oder der zugehörigen Genprodukte in vivo, sowie für die Entwicklung von Diagnostika;
- die Verwendung der virulenzbestimmenden Gene für die Diagnostik virulenter *Pseudomonas aeruginosa* - Stämme.

15

Im einzelnen umfasst die Erfindung daher:

1. Isolierte oder rekombinante Nukleinsäuren gemäß den Sequenzen zu Seq. ID 1, Seq. ID 2 und Seq. ID 3 oder hierzu degenerierte oder modifizierte homologe Sequenzen mit entsprechender Funktion, wobei die Modifikationen insbesondere Deletionen, Insertionen und/oder Substitutionen von Aminosäuren umfassen, insbesondere Punktmutationen, Verkürzungen, Verlängerungen und dergleichen, soweit diese die Funktion insgesamt bezüglich der Überlebensfähigkeit des Mikroorganismus nicht wesentlich beeinträchtigen ;
2. Proteine, welche kodiert werden durch eine der vorgenannten Sequenzen oder hierzu homologe, im wesentlichen funktionsgleiche Proteine oder Peptide, insbesondere solche mit durch Deletion, Insertion oder Austausch einzelner und/oder mehrerer Aminosäuren, sequenzverlängerndes Anfügen von einzelnen und/oder mehreren Aminosäuren und/oder chemischer Derivatisierung insbesondere der terminalen Aminosäuren verbundener Sequenz-Modifikation.

3. Verwendung der Nukleinsäuren oder Nukleotidsequenzen PA0740, PA1288, PA1322, PA1441, PA1572, PA1992, PA2591, PA3344, PA4621, PA5040, PA5349 und/oder PA5415 des Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*, bezeichnet gemäß Nomenklatur des *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project (s. "www.pseudomonas.com"), und/oder der Nukleinsäuren oder Nukleinsäuresequenzen nach Seq. ID 1, 2 oder 3, oder der jeweils zugehörigen *Pseudomonas aeruginosa*-eigenen Proteine, die sämtlich für die Überlebensfähigkeit des Mikroorganismus in Mensch oder Tier wesentlich sind, als Targets für die Entwicklung von Diagnostika zur Identifizierung der Virulenz eines *Pseudomonas aeruginosa* Stammes, für die Entwicklung von Therapeutika gegen *Pseudomonas aeruginosa* Stämme sowie für die Entwicklung von Impfstoffen gegen *Pseudomonas aeruginosa* Stämme.

Anstelle von oder in Verbindung mit PA 1441 können auch die Sequenzen PA1104 und/oder PA1452 verwendet werden.

Verwendbare Proteine umfassen auch zu diesen homologe Proteine oder Proteinbruchstücke der Proteine und homologen Varianten, insbesondere solche mit durch Deletion, Insertion oder Austausch einzelner und/oder mehrerer Aminosäuren, sequenzverlängerndes Anfügen von einzelnen und/oder mehreren Aminosäuren und/oder chemische Derivatisierung insbesondere der terminalen Aminosäuren verbundener Sequenz-Modifikation.

4. Antikörper, die gegen durch eines der Nukleinsäuresequenzen PA0740, PA1104, PA1288, PA1322, PA1441, PA1452, PA1572, PA1992, PA2591, PA3344, PA4621, PA5040, PA5349 und PA5415 des Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*, bezeichnet gemäß Nomenklatur des *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project, oder der Nukleinsäuresequenzen gemäß Seq. ID 1, 2 oder 3 kodiertes Protein oder wenigstens ein funktionelles Fragment eines der vorgenannten Proteine gerichtet sind, für die Verwendung bei der Bestimmung der Virulenz von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen.

5. Vakzine, enthaltend wenigstens ein durch eine der Nukleinsäuresequenzen PA0740, PA1104, PA1288, PA1322, PA1441, PA1452, PA1572, PA1992, PA2591, PA3344, PA4621, PA5040, PA5349 und PA5415 des Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*, bezeichnet gemäß Nomenklatur des *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project, oder der Nukleinsäuresequenzen gemäß Seq. ID 1, 2 oder 3 kodiertes Protein oder wenigstens ein funktionelles Fragment eines der vorgenannten Proteine, oder wenigstens ein auf dem Protein oder funktionellen Teil des Proteins basierendes Fusionsprotein sowie
- 10 Vakzine, enthaltend wenigstens eine der Nukleinsäuren gemäß Sequenzen PA0740, PA1104, PA1288, PA1322, PA1441, PA1452, PA1572, PA1992, PA2591, PA3344, PA4621, PA5040, PA5349 und PA5415 des Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*, bezeichnet gemäß Nomenklatur des *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project, oder der Nukleinsäuren gemäß Seq.
- 15 ID 1, 2 oder 3, in modifizierter, in Säugetierzellen ablesbarer Modifikation und in Zuordnung zu einem in Säugetierzellen ablesbaren Promotor.

In Weiterbildung der Erfindung können die Gene mit dem zugehörigen Promotor in ein Plasmid ligiert vorliegen. Weiterhin können vorzugsweise übliche Zusatz- und

20 Hilfsstoffe sowie insbesondere wenigstens ein Adjuvans in dem Impfstoff enthalten sein.

Bei den Sequenzen Seq. ID 1, Seq. ID 2 und Seq. ID 3 handelt es sich um folgende neu identifizierte Gensequenzen:

25

Seq. ID 1

DNA- Sequenz:

30 CTGCAGGGCTACGCTGAGGGAGTTGTAGAGGAGGCCGATGACAACACCCTGC
GCATCCGGCTAGCCCATGGCCTTCGAGTCAAAGAAGCGTCTCCCGCCGCCGA
TGACGTGGCCGACGTTCCGCGTACGCCGGGGTTAAGAAGCCTTCGATACGT
CTGCTCGGGCTGCTCCAGCTGCTGTGGTTAGAGGCTGGACTGGCCAACTGGT
ACCCACTGATGGAAGGCAAGCGAACGCCCGCGAATGTTGCCTATTGGGTATCT
35 GAAGCCGCAAAGCGTATCCGGGCCAGCCGAATGACGGTGTTCGACGTCTTGC
TGATGTCTGGCCAAGAAGAACTCCCGCATGGCGAAGCGCAATGCTGAGGTCGT

GGAGCTGGCGCAGGAGCATTGCGCGAGGCTCATTGCGGTGTCGCCGCTGGC
GTCCTTCAACTCGGAACGACGCAATCTCTTGACGCTTTCTGTCTCGGGACCCTT
CGGGATGCCGACGATGGACATTCGAGCGGA

- 5 Dieses DNA- Sequenz ist sowohl für das intrazelluläre Überleben als auch für das Quorum Sensing von *P. aeruginosa* von entscheidender Bedeutung. Diese Sequenz ist nicht in allen, aber in den meisten pathogenen Isolaten von *P. aeruginosa* vorhanden. Eine Zerstörung dieser Sequenz oder des davon kodierten Genprodukts führt zu einem Ausschalten des Quorum Sensings und so zu einer Verringerung der
- 10 Pathogenität

Seq. ID 2

- 15 DNA- Sequenz:

TGCAGGATCTGGGTCAGGTTGTCGATCAGGTTCTGGGTCAGCGAATTCAGAGC
TCTCATTTCGTCCTGGCACTCCACTGCCGGTTGGTCTGGGAAATTAATTGGGAA
GGGCGGCAGGCCGCGCGCCTTGTCGAGATCCGCTGCGACCTGCAAGGCCGC
20 CTCGAGCTCGTCGCAGCCGGTGGCTTGCATGATGTTGTAGCGCTGGTTCTTTT
CTTCGTTTTTCGGTCATGGCCAGGGCCAGGTAGAGACTCGGGGGAACACACG
GAAGAGGTACTCCTTGCCCTTGCCAGGAGCACGCCCTCGGTGAATTTGCCG
CTTTCCTTGCGGGCCGAGAGCATCATCGACTTCTGCGCCGGCGACAGCTCGC
GGAACCTGGAGATCTTCTCTACCTCGTCTGGGGGCATGTTCAGGCACAACCAC
25 CACTCGATCATGTTTACGATCGGCGCCCCGGAGGCTGGGATGTCGTCGATGTT
CTGGGTGGCGAGCCAGAACCAGGCGCCAGTTTCCGCCACATCTTGGTGATC
TTCATGGCGTAGGGCAGCAGCAGCGGGTGCTTGGTGATGATGTGTCCCTCATC
GGTGATCTTGACGATGGGCCGGCCCTTGAATTGGTTCGCGTTTCGGCGATGTTGT
TTACGGTGTTTCAGCAGCGAGATGTAGGCGATCCCGAGCTGGGCGGCGTAGCC
30 TTCGCGCGCGTAAGTCGCGAAATCCACCACGGTGAGGTCGGCTTCAGGCCAG
GGCGTGCCTTTGCGATTGAACATCTCGCC

Seq. ID 3

- 35 DNA- Sequenz:

ATGCGTTGGAAACTCCCCTGGCCGAAGCTGGCCGCACCGAAGCTGGCCGCGT
CCGGCGCTGGCGATGACGAGCAGCCGGACGGCTGGCAGCGCCACGTCGAGG
CACTGCACCAGGCCGGCATCCCCGAACCCGGCACGGCGGTGCAAGGTCACA
40 GGCCGGCGACCATGGCAGACGAGCAGACGCTGTATGAGGTCGCGCCGTCGTT
CGTGGAATACTGCCCTGGGTGGAGTTCCTGCCGCAGTCGAAGGCCATGTTG

CTGGAGGACGGGCAATCGGTGGCGGCCTTTTACGAGCTGGTGCCGCTGGGCA
CCGAAGGCCGGGAACCCGGCTGGCTCGCGCAGGCCCGCGATGCCTTGGAGA
ACGCGCTGCAGGACAGTTTCGATGAACTGGACGAACTCCCTGGGTGTTGCAG
CTCTACGCCCAGGACGAGCCCAGTTTTGACCAGTACATGCAGACCCTGCGCGA
5 CTATGTGCAGCCGCGCGCCCCGTGATACAGCGTTCAGCGAGTTCTACCTGCGCT
TCTTCGGCCACCACCTGCGCGCGGTGGCCAAGCCGGGCGGCCTGTTGAGG
ACACTGTGGTCACACGGCTGCGCTGGCGCGGCCAGACCCGGCGCGTGCACA
TGGTGGTCTACCGCCGCGTGACCGGGCAAGGGGCAAACAGCCGTGCGGGGC
AGACGCCCAGCAGATGCTCAATATCGTCTGCGACCGCCTGTGCGGCGGACT
10 GCGGAACGCCGGCATTGAGGCCCGGCGCATGGTCGCGGCAGATGTTTATGAC
TGGTTGCTGCGCTGGTTCAACCCGCGCCCCACGTTGCTCGGGCCTGGGGCCG
AAGACCGGGAGCGCTTCTATACATTGGCGCGCTATCCCGACAGTGCGGAGGA
AGGCGAGGACGGCGAGATCGAGCTGGCGAGCGGACGGGATTTTCAGCCAACG
GCTGTTCTTCGGCCAGCCGCGTTCGACGTGGCGCACGGCACCTGGCATTTC
15 GACGGCATGCCGCACCGCGTGCTGATCACCGACCGCCTGCGCATGCCGCCAG
GCACGGGACACCTGACCGGCGAGACGCGCAAGGGCGACGCCATCAACACGTT
GTTGACACAGATGCCCGAGGACACCATCCTTTGCCTGACGCTGGTCGCCACG
CCGCAGGATGTTCTCGAAGCGGATCTCAATCATCTGGCGAAGAAGGCCGTGG
GCGAAACCTTGGCATCCGAGCAGACGCTCAAGGACGTGCATGAAGCCCGCTC
20 CCTGATCGGCAGCGCGCACAAAGCTCTATCGTGGCACGCTGGCGTTTCTACCTG
CGCGGGCGCGACGAGGCGGAAGTGGATCGGCGCGGCCTCGACCTGGCGAAC
GTCATGCTCAACGCCGTTTGCAGCCGTTTCGCGAAGACGACGAGGTGGCAC
CGCTGAACAGCTACTTGCGCTGGCTGCCGTGCTGCTACAACCCCGGCCAGGA
TCGGCGCAAGTGGTACACCCAAGTATGTTTCGCCAGCACGCGGCGAACCTC
25 TCGCCCGTGTGGGGCCGCGCCCAAGGTACGGGGCACCCCGGCATCACGATG
TTCAACCGCGGCGGCGGGCCGATCACCTTCGACCCGCTCAACCGCCTGGATC
GGCAGATGAATGCCACCTGTTTCTGTTTCGGCCCGACAGGTTTCAGGCAAGTCG
GCGACCCTCAACAACCTCTTGAATCAGGTCACGGCGATCTACCGTCCCCGCCT
GTTTATTGTCGAGGCCGGCAACAGCTTCGGCTTGTTTCAGCGACTTTGCCCGGC
30 GCCTGGGCCTGACCGTGAATCGGGTCAAGCTCGCTCCGGGCTCGGGCGTTAC
CCTGGCGCCGTTTCGCGGATGCGCGCCGGCTGATCGAGACGCCAGCGACGT
GCAGACGCTCGACGCCGATGCGCTGGATGAAGACCTGCCTCCCGATGCTGTG
GCCATGGAGGCAGATGAGCAGCGCGACGTACTGGGTGAACTGGAGATCACCG
CGAGGCTGATGATCACCGGCGGCGAAGATAAAGAAGAAGCCCGGATGACGCG
35 AGCCGACCGCTCACTGATCCGTCAAGTGCATCCTCGATGCCGCCGAGCACTGC
CACAGCAAGGATGGCGAGAAGCGAACCGTTCTCACGCGCGATGTGCGCAACG
CGCTGCGCACGCGCAGCCAGGACCCGACGCTGCCGGAATGCGGCGTGTGC
GACTGCTGGAGATGGCCGACGCCATGGACATGTTCTGCCAAGGCACGGACGG
CGAAATGTTTCGACCGCGACGGTTCGCCGTGGCCCGAAGCCGACATCACCTG
40 GTGGATCTGGCGACCTATGCCCGCGAAGGCTACAACGCGCAGCTCTTATTGC
CTACATCAGCCTGATCAGCACGGTGAACAACATTGCCGAGCGCGATCAGTACC
TGGGCCCGCCGATCATCAACGTACCCGACGAAGGACACATCATCACCAGAAG
CCGCTGCTCGCACCCCTACGTGGTGAAGATCACCAAGATGTGGCGCAAGCTGG
GGGCCTGTTTCTGGCTCGCCACACAAAACATCGACGACTTGCCGCGCGCTGC
45 AGAGCCCATGCTCAACATGATCGAGTGGTGGATCTGCCTGTCGATGCCGCC
GATGAGGTGGAGAAGATCGCGCGGTTCCGCGAACTCTCGCCTGCGCAGAAGG
CGCTGATGCTTTCCGCGCGCAAGGAAGCCGGGAAGTTACCGAGGGCGTCAT
CCTCTCCAAGAGCCTGGAAGTGCTGTTTCGGGCCGTGCCACCGAGCCTCTATC
TCGCGCTCGCGCAGACGGAACCCGAGGAGAAGGCCGAGCGTTACCAGCTCAT

GCAGCAACACGGCATCAGCGAACTCGATGCGGCCTTCAAAGTGGCCGAGAGA
ATCGACCAGGCGCGCGGCATCAAGTCGCCAGCCGTGGGCCTGCCGCAATAG

Die mit D8A6 beschriebene Sequenz (Seq. ID 2) ist zu einem Teil des mit CB31
5 (Seq. ID 3) beschriebenen ORFs (open reading frame = der Teil eines Gens, der in
ein Protein übersetzt wird) homolog. Dieser ist Teil einer bisher nicht beschriebenen
hoch homologen Genfamilie, die in den meisten *P. aeruginosa*- Stämmen und wei-
teren gram- negativen Bakterien (weitere Pseudomonas- Arten wie *P. syringae*, *P.*
fluorescens und Gattungen wie *Ralstonia*, *Burkholderia*) im gleichen Habitat vor-
10 kommt. Dieser ORF kodiert für ein Protein, das für die Funktion des Quorum Sen-
sing essentiell ist. Durch die Transposoninsertion in D8A6 wurde die Produktion
und Freisetzung von Homoserinlactonen (die Botenmoleküle des Quorum Sensings)
unterbunden. Eine Ausprägung eines pathogenen Phänotyps ist daher nicht mehr
möglich. Zusätzlich erlaubt die hohe Konservierung der von den D8A6- homologen
15 Sequenzen codierten Proteine eine Regulation der Expression von Pathogenitäts-
faktoren über die Speziesgrenzen hinweg. Somit ist z.B. D8A6/CB31 eine der not-
wendigen Sequenzen, damit stabile Co- Kolonisierungen in der Lunge eines CF-
Patienten (hier zwischen *P. aeruginosa* und *Burkholderia cepacia*) möglich sind.
Diese stabilen Mehrfach- Besiedelungen führen sehr oft zu einer schnellen und fa-
20 talen Verschlechterung des Gesundheitszustandes der betroffenen Patienten.

Durch einen Eingriff in diese Regulationskette (durch Therapie oder Impfung) ist
eine deutliche Verbesserung des Krankheitsbildes von Co- kolonisierten Patienten
zu erwarten. In der Diagnostik bieten sich diese Gene an, um somit festzustellen, ob
25 ein pathogener *P. aeruginosa* in der Lage ist, im Patienten eine stabile Coexistenz
mit anderen Bakterien aufzubauen, was seine Gefährlichkeit erhöhen würde.

Die Verwendung des Gens PA1441 kann für die erfindungsgemäßen Zwecke er-
30 setzt oder kombiniert werden mit der Verwendung der Gene PA1452 und/oder
PA1104, da diese Gene in ihrer Funktion zusammenwirken (s. PA1441).

Im Rahmen der Erfindung wurden *P.aeruginosa*- Mutanten auf ihre Überlebensfä-
higkeit in neutrophilen Granulozyten untersucht. Die identifizierten Gene sind für

P.aeruginosa unbedingt erforderlich, um den Kontakt mit diesen Zellen zu überleben. Bakterien, denen diese Gene also fehlen, können daher leichter durch eine zelluläre Immunantwort abgetötet werden. Zusätzlich wiesen einige der auffälligen *P.aeruginosa*-Mutanten auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Komplementsystem des Blutserums auf.

Die Virulenz wird im Rahmen dieser Erfindung auf folgende Weise klassifiziert:

Zur Beurteilung wird das Quorum-Sensing und das Überleben solcher *Pseudomonas aeruginosa*-Mikroorganismen, bei denen ein Virulenzgen inaktiviert wurde, in Granulozyten herangezogen. Die Klassifizierung wird nachfolgend noch näher erläutert.

Durch Verwendung der hier gefundenen Virulenz-Gene, die für Oberflächenproteine kodieren, als Ziel einer Impfstrategie ist es nun möglich, für die Bakterien im geimpften Organismus eine Umgebung zu schaffen, an die sie sich nicht mehr anpassen können. Wenn sie ihre Oberflächenproteine behalten, sind sie von den Antikörpern angreifbar, verzichten die Bakterien dagegen auf sie, sind sie nicht länger in der Lage, sich gegen die neutrophilen Granulozyten zu verteidigen.

Neben der Verwendung einiger Oberflächenproteine als Impfstoffe können diese Proteine auch als Marker für eine Abschätzung des pathogenen Potentials eines *P.aeruginosa* dienen. Zusätzlich sind für solche diagnostischen Untersuchungen auch intrazelluläre Proteine geeignet, die für die Pathogenität und Resistenz gegenüber der Immunantwort eine hohe Bedeutung haben, selbst aber aufgrund ihrer Lage nicht für Antikörper zugänglich sind. Über Untersuchungen mit ELISA oder PCR, bei dem diese speziellen Gene adressiert werden, ist es möglich, Aussagen über das pathogene Verhalten eines Bakteriums zu machen (z.B. Resistenz gegen oxidativen Streß, Fähigkeit zum intrazellulären Überleben, Ausbildung von Biofilmen, Motilität durch Flagellen oder Pili, Resistenzen gegen Antibiotika) und so z.B. die Antibiotikatherapie eines Patienten individuell auf die Fähigkeiten des ihn befallenen Bakteriums abzustimmen.

Die hier identifizierten Gene stammen aus den Bereichen: Resistenz gegen oxidativen Streß, Fähigkeit zum intrazellulären Überleben, Ausbildung von Biofilmen und Motilität durch Flagellen oder Pili.

5 Genidentifizierung

Die Identifizierung der erfindungsgemäßen Gene erfolgte mit Hilfe der Transposonmutagenese. Dabei wurde zunächst eine Mutanten-Bibliothek erstellt und festgestellt, ob die jeweiligen Mutanten noch virulent waren oder nicht.

10

Für solche Mutanten, bei denen das Quorum sensing und/oder die intrazelluläre Persistenz modifiziert oder ausgeschaltet worden war, wurde eine Funktionsanalyse des jeweiligen Gens angeschlossen, soweit die Funktion nicht bekannt war.

15

Transposonmutagenese

Bei der Transposonmutagenese wird mit Hilfe eines geeigneten Vektorsystems ein Transposon in eine Zelle eingeführt und in das Genom integriert. Hierbei wird durch eine Transposase die genomische DNA- Sequenz mit einem Einzelstrang-Überhang geschnitten und das Transposon mit glatten Enden integriert. Eine DNA-Polymerase füllt die entstandenen Lücken auf, so daß links und rechts der Transposoninsertion eine Duplikation der DNA- Sequenz stattfindet. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Transposon *Tn5* erfolgt die Insertion sequenzunabhängig mit einer Sequenzduplikation von 9-12 Bp. Erfolgt die Insertion in einem kodierenden Abschnitt, wird ein Gen ausgeschaltet und gleichzeitig markiert. Tritt durch diesen Verlust eine phänotypische Veränderung auf, so ist die betreffende Mutante selektierbar. Ausgehend von der bekannten Transposonsequenz kann eine Sequenzierung des umliegenden DNA- Bereichs erfolgen.

Zur irreversiblen Transposonmutagenese wurde hier ein mini- *Tn5*- Derivat im Vektor pTnMod-OGm verwendet (DENNIS & ZYLSTRA 1998).

30

Bei pTnMod-OGm liegt der Replikationsursprung *oriR* PMB1 im mini- Transposon, so daß nach der genomischen Insertion das übrige Plasmid mit der Transposase nicht mehr replizierbar ist. pTnMod-OGm in Fig. 1 dargestellt.

- 5 Wird nun auf die vom Transposon vermittelte Resistenz selektiert, so werden alle Bakterien ohne Transposoninsertion abgetötet und nur die Mutanten können wachsen.

Soll überprüft werden, ob ein auf diese Weise ausgeschaltetes Gen für die Ausprägung eines bestimmten Phänotyps verantwortlich ist, kann dies durch den Vergleich von Originalstamm und Transposonmutante in einem geeigneten Differenzierungsansatz geschehen. Kann der Ausgangsstamm eine bestimmte Selektionsbedingung überleben, der Mutant dagegen nicht, so ist das ausgeschaltete Gen für das Überleben unter diesen ausgewählten Bedingungen essentiell.

Das Screening der Mutanten kann mit Hilfe verschiedener hierfür entwickelter bekannter Verfahren erleichtert werden. Hierzu gehören u.a. das Signature-Tagged Mutagenese (STM)-Verfahren , die "in vivo Expressionstechnologie (IVET) und Verfahren unter Nutzung der DNA-Chiptechnologie

Das STM-Verfahren ist beispielsweise beschrieben in
Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E, Holden DW. *Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection*. (1995)
Hensel M. *Whole genome scan for habitat-specific genes by signature-tagged mutagenesis*. (1998)
Chiang SL, Mekalanos JJ, Holden DW. *In vivo genetic analysis of bacterial virulence*. (1999)
Mecas J. *Use of signature-tagged mutagenesis in pathogenesis studies*. (2002)

Die In Vivo Expressionstechnologie (IVET) ist ein Verfahren zur Identifikation aller Gene, die unter definierten Selektionsbedingungen verstärkt exprimiert werden (MAHAN ET AL. 1993; MAHAN ET AL. 1995; SLAUCH ET AL.1994;RAINEY ET AL.1997).

Die Anwendung der DNA- Chiptechnologie setzt voraus, daß das Genom des zu untersuchenden Organismus vollständig sequenziert ist. Unter dieser Voraussetzung ist es möglich, einen DNA- Chip zu konstruieren, auf dem die Sequenzen aller putativen ORFs fixiert sind. Wird aus diesem Organismus die
5 gesamte mRNA gewonnen, mit Hilfe von Zufallssequenzen in cDNA- Fragmente umgeschrieben und entsprechend markiert, so kann durch Hybridisierung mit dem DNA- Chip ein Expressionsprofil des gesamten Genoms unter den gewählten Wachstumsbedingungen erstellt werden. Durch Vergleich der Expressionsprofile in verschiedenen Habitaten ist die Identifizierung aller Unterschiede im
.0 Expressionsmuster möglich (WEI ET AL. 2001).

Ergebnisse der Mutationsexperimente und Funktionszuweisung der ermittelten Gene

.5 Sequenzierungen

Die Sequenzierung der flankierenden Bereiche der mit Hilfe von Plasmiden eingeführten Transposoninsertionen wurde extern durchgeführt (industrielle Auftragssequenzierung). Die daraus erhaltenen Sequenzen wurden, mit BlastN auf Nukleotidebene und BlastX auf Proteinebene, auf ihr Vorkommen im bereits
2.0 sequenzierten PAO- Genom (www.pseudomonas.com) untersucht.

War die Sequenz bekannt, wurde der jeweilige Promotorbereich des identifizierten Gens auf beiden DNA- Strängen überlappend sequenziert. Wurden in der DNA- Sequenz des getroffenen Gens zusätzlich Sequenzvarianten gefunden, die einen Aminosäureaustausch des kodierten Proteins verursachten, wurde das Gen mit
2.5 PCR amplifiziert und erneut sequenziert (Qiagen). Nicht kodierende Sequenzvarianten wurden nicht weiter überprüft. Nur wenn die Ergebnisse aller Sequenzierungen übereinstimmten, wurde eine Nukleotidsubstitution als bestätigt akzeptiert.

3.0 Bei unbekannten Sequenzen wurde in der NCBI- Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) mit BlastN und BlastX nach homologen Sequenzen gesucht.

Die Ergebnisse der Sequenzierungen sollen hier nur kurz dargestellt werden. Die Sequenzen selbst sind -soweit nicht im PAO - Genom vorhanden- im Sequenzprotokoll dargestellt. Eine genaue Interpretation und Bewertung der Resultate erfolgt anschließend für jeden Transposonmutanten separat. Die angegebene Nummerierung der Gene, die Prozentangabe der Sequenzidentität und die Beschreibungen beziehen sich auf die Angaben in der PAO- Datenbank.

Gen-Nr.	Vergleich mit PAO- Sequenz		Beschreibung
	Identität (%)	Sequenzvarianten	
PA0740	99,4	*, (6)	Homoserinlactonase
PA1104	98,0	*, (8)	<i>fliI</i>
PA1288	99,6	(2)	<i>fadL</i> -, <i>ompP1</i> - homolog
PA1322	99,7	(2)	<i>pfuA</i>
PA1441	99,6	A-V, V-A, (1) P:2	<i>fliK</i> - homolog
PA1452	99,7	(3)	<i>fliH</i> A
PA1572	99,6	T-A, *, (1)	hypothetisches Protein
PA1992	100		Sensorprotein
PA2591	100		Transkriptionsregulator
PA3344	99,4	(3)	<i>recQ</i>
PA4621	99,8	L-F, *, P:1	Oxidoreduktase
PA5040	99,4	(3)	<i>pilQ</i>
PA5349	99,8	(2)	Rubredoxin-Reduktase
PA5415	98,8	G-A, R-Q, (8)	Serinhydroxymethyl-transferase

L0

Tabelle 3.13. Liste der Sequenzierungsergebnisse. Die Spalte „Sequenzvarianten“ enthält die jeweiligen Aminosäuresubstitutionen im Protein (der erste Buchstabe steht für die PAO- Sequenz, der zweite für die in *P.aeruginosa* TB gefundene). Ein

„*“ bedeutet, daß das Gen aufgrund seiner Länge nicht vollständig sequenziert wurde. Weitere Sequenzvarianten in der DNA-Sequenz dieses Gens sind daher möglich. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der nichtkodierenden Nukleotidsubstitutionen an, die Angabe hinter dem Kürzel „P“ steht für die Mutationen im Promotorbereich.

Bis auf drei unbekannte Sequenzen ohne Homologien in den Datenbanken sind alle anderen 14 DNA-Sequenzen der PAO-Sequenzierung bekannt. Die Sequenzidentität beträgt durchschnittlich 99,6%.

Zur Identifizierung der vorliegenden Gene wurde eine große Anzahl von Transposonmutanten auf ihre Überlebensfähigkeit in einem bestimmten Habitat untersucht. Als Ergebnis erhält man die Information, welche Gene essentiell für das Überleben unter den gewählten Selektionsbedingungen sind.

Im folgenden sind die sequenzierten Transposonmutanten mit den jeweiligen Ergebnissen der *in vitro*- und *in silico*-Untersuchungen aufgelistet. Im Einzelfall wurden auf der Grundlage dieser Daten weitere Untersuchungen zur phänotypischen Charakterisierung der Mutanten durchgeführt. Diese Resultate sind ebenfalls vermerkt. Die phänotypischen Eigenschaften des jeweiligen Mutanten werden näher beschrieben. Abschließend werden die vorhandenen Informationen zu jedem Transposonmutanten zusammenfassend diskutiert.

Bei der Auflistung der phänotypischen Eigenschaften ist bei den Transposonmutanten, deren intrazelluläres Überleben in Granulozyten quantitativ bestimmt wurde, ein Quotient Q_{AB} aufgeführt. Dies ist der Quotient aus der Überlebensfähigkeit in AB-Serum geteilt durch die Überlebensfähigkeit in Granulozyten. Der Wert gibt an, um wieviel der entsprechende Transposonmutant im AB-Serum besser überlebte als phagozytiert in Granulozyten. *P.aeruginosa* - Mutanten, deren intrazelluläres Überleben beeinträchtigt ist, erhalten somit Werte, die deutlich größer als Eins sind. Bakterien, die dagegen serumsensitiv sind, in Granulozyten aber weiterhin gut persistieren können, weisen Werte kleiner/gleich Eins auf.

PA0740**Phänotypische Eigenschaften**

	Quorum Sensing	:	Verstärkt
5	weitere Eigenschaften	:	Verstärkte Proteasesekretion

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

.0	Gen- Nummer	:	PA0740
	Bezeichnung	:	<i>yjcS</i>
	Funktion	:	Lactonase, früher angenommen: β- Lactamase
.5	Strukturmerkmale / Homologien	:	62% Ähnlichkeit mit hypothetischem Protein YjcS aus <i>E.coli</i> Strukturmerkmale der Metallo- β- Laktamase Superfamilie
	Nukleotidsubstitutionen	:	synonym: 452T - C; 545T - G; 551T - C; 893C - T; 908T - C; 950T - C
20	Länge	:	1977 Bp = 658 As.

Einfluß auf benachbarte Gene

Alle Gene in der Umgebung von PA0740 werden auf dem anderen DNA- Strang kodiert. PA0740 selber hat eine typische Promotor- und Terminatorstruktur. Cis-
 25 Effekte sind somit auszuschließen.

weitere Untersuchungen

Eine Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) verschiedener β-
 Lactam- Antibiotika zeigte keine gesteigerte Sensibilität des Transposonmutanten
 30 im Vergleich zum Wildtyp. Eine Untersuchung der Kulturüberstand zeigte, daß bei
 einem Mutanten mit einer Transposoninsertion in PA0740 die Homoserinlacton-
 Konzentration deutlich erhöht ist.

Zusammenfassung

Bei PA0740 handelt es sich entgegen der Annotation im Genomprojekt nicht um eine β -Lactamase, sondern um eine Homoserinlactonase, die für *P. aeruginosa* notwendig ist, um die beim Umschalten in die stationäre Wachstumsphase anfallenden Homoserinlactone anzubauen. (Ein Substrat aus der Klasse der β -Lactame konnte für PA0740 nicht gefunden werden.) Berücksichtigt man die Homologie zu den β -Lactamasen, deren Funktion in der Spaltung des Ringsystems der β -Lactamantibiotika liegt, so kann man vermuten, daß PA0740 eine Homoserinlactonase ist, die einen ersten Schritt im Abbau der Homoserinlactone durch Spaltung deren Ringstruktur katalysiert. Das Ausschalten dieses Gens hat einen deutlichen Anstieg der Konzentration an Homoserinlactonen im Medium und damit eine verstärkte Reaktion der Bakterien auf dieses Signal zur Folge, z.B. eine deutlich gesteigerte Sekretion von Proteasen.

PA1288

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit in Granulozyten:	0,07
in AB- Serum:	0,8
Q_{AB} :	11
Quorum Sensing :	Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften :	keine Proteasesekretion, erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Peroxiden

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA1288
Funktion :	mögliches Transportprotein der äußeren Membran
Strukturmerkmale / Homologien :	47% Ähnlichkeit zu <i>fadL</i> (Transporter für langkettige Fettsäuren in der äußeren Membran von <i>E.coli</i>)

- 19 -

in der äußeren Membran von *E.coli*)
 43% Ähnlichkeit zu *ompP1* aus *Haemophilus influenzae* (möglicher Virulenzfaktor)

5 Nukleotidsubstitutionen : synonym: 638C -T; 935C -T
 Länge : 1275 Bp = 425 As.

Einfluß auf benachbarte Gene

Hinter PA1288 befindet sich eine deutliche Terminationsschleife. Die nächsten drei
 .0 Gene sind auf dem Gegenstrang kodiert. Ein direkter Einfluß der
 Transposoninsertion auf die umliegenden Gene ist daher sehr unwahrscheinlich.

weitere Untersuchungen

Der hauptsächliche Streß, dem die phagozytierten Bakterien in Granulozyten
 .5 ausgesetzt sind, ist oxidativ. Zur Simulation dieser Bedingungen wurde ein
 entsprechender Transposonmutant 14C5 auf LB- Agar mit unterschiedlichen
 Konzentrationen an Wasserstoffperoxid ausgestrichen und bei 37°C für 16 Stunden
 inkubiert. Der auf die Bakterien ausgeübte Streß dauerte somit auch nicht über die
 ganze Inkubationszeit an, sondern wirkte nur initial für relativ kurze Zeit. Wurden die
 20 *P.aeruginosa* in dieser Anfangsphase nicht abgetötet, konnten sie anschließend
 unbehelligt wachsen.

Es ergab sich, daß die Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid bei den
 Transposonmutanten mit Insertionen in PA1288, PA3344, PA4621 und PA5349 im
 Vergleich zum Wildtyp deutlich eingeschränkt ist.

25

weitere Informationen

Zu PA1288 existieren im *P.aeruginosa* PAO - Genom zwei paraloge Gene (PA4589
 und PA1764), die beide in der PAO- Datenbank als mögliche Membranproteine der
 äußeren Bakterienmembran geführt werden. Weitere Informationen waren in den
 30 Datenbanken nur zu *fadL* und *ompP1* zu erhalten.

***fadL*:**

FadL transportiert langkettige Fettsäuren durch die äußere Zellmembran. Ein
 zweites Enzym (Fettsäure- Acyl- CoA Synthetase (FACS)) transportiert die

Fettsäuren dann durch die innere Zellmembran und führt sie nach Aktivierung mit CoA der β -Oxidation zu. FadL legt dabei die Spezifität der Aufnahme fest, FACS macht den Aufnahmeprozess irreversibel (DiRusso CC, BLACK PN, 1999). Die Struktur von FadL entspricht einem β -Faß aus 20 antiparallelen Strängen, deren Aminosäuresequenz die Spezifität des so gebildeten Kanals festlegen. FadL wird vor allem während der stationären Wachstumsphase von *E.coli* exprimiert. Bakterien, bei denen FadL durch Mutation ausgeschaltet wurde, zeigen nur eine geringe Veränderung in der Proteinzusammensetzung beim Übergang von der logarithmischen zur stationären Phase und überleben nur kurze Zeit bei limitiertem Nährstoffangebot (FAREWELL A ET AL. 1996).

ompP1:

OmpP1 ist ein Protein der äußeren Zellmembran von *Haemophilus influenzae*. (BOLDUC GR 2000). Es existieren in *H.influenzae* verschiedene Varianten dieses Proteins. Während der Infektion eines Wirtsorganismus ist das Protein exprimiert und wird auch bei einer spezifischen Immunantwort gegen seine äußeren Epitope in seiner Expression nicht herunterreguliert. OmpP1 eignet sich daher prinzipiell zur Immunisierung gegen *H.influenzae*.

Zusammenfassung

PA1288 kodiert für ein Protein, daß von seiner Struktur her einem β -Faß entspricht. Die Spezifität des so gebildeten Kanals bleibt unbekannt, vermutlich ist das erkannte Substrat hydrophob (aliphatisch oder aromatisch). Auf der Basis der in der Literatur beschriebenen orthologen Gene ist anzunehmen, daß das entsprechende Substrat innerhalb des Bakteriums mit Coenzym A aktiviert und metabolisiert wird (z.B. β -Oxidation).

Aus den durchgeführten Untersuchungen war bekannt, daß die Funktionsfähigkeit von PA1288 für die Produktion von aliphatischen Homoserinlactonen und das intrazelluläre Überleben in Granulozyten essentiell ist. Diese Beobachtungen werden durch die in der Literatur beschriebenen Untersuchungsergebnisse in *E.coli* und *H.influenzae* bestätigt (s.o.). Die genaue Aufgabe dieses Proteins ist für *P.aeruginosa* nicht bekannt, das orthologe Protein FadL aus *E.coli* ist jedoch detailliert untersucht worden. In *E.coli* transportiert FadL langkettige Fettsäuren

durch die äußere Zellmembran. Bei äußerem Streß (hohe Wachstumsdichte oder Inkubation bei 42°C) wird die Expression dieses Gens deutlich verstärkt. Ein Ausschalten von *fadL* führt dazu, daß die Bakterien nicht länger aus dem logarithmischen Wachstum in die stationäre Phase umschalten können. Ebenfalls
5 werden Hungerphasen von diesen Mutanten nur schlecht überlebt. In *Haemophilus influenzae* ist ein entsprechendes orthologes Gen notwendig für die Infektion. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß auch in *P.aeruginosa* die Funktion des FadL-ähnlichen Proteins in irgendeiner Weise mit der Antwort auf äußere Streßfaktoren verbunden ist.

10 Auf welche Weise PA1288 einen Einfluß auf die Produktion der Autoinducer oder die intrazelluläre Stabilität ausübt, kann nicht zweifelsfrei erklärt werden. Eine Hypothese wäre, daß PA1288 essentiell für die Aufnahme von langkettigen aliphatischen Verbindungen notwendig ist, die nach weiterer Prozessierung als Acyl-Seitenketten in der Produktion von aliphatischen Homoserinlactonen (AHL)
15 notwendig sind. Dies würde auch erklären, warum das entsprechende Gen in *E.coli* in der stationären Phase hochreguliert wird. Unter diesen Bedingungen ist die Produktion an AHL am höchsten und somit auch der Bedarf an aliphatischen Verbindungen zum Aufbau der Seitenkette der Homoserinlactone. Der Knock-out von PA1288 könnte somit die Synthese von AHL in *P.aeruginosa* blockieren.

20 Die Transposonmutanten waren nicht mehr in der Lage, auf verschiedene Arten von äußerem Streß angemessen zu reagieren: Intrazellulär in Granulozyten konnten die Bakterien den oxidativen Streß nicht überleben, und bei der Untersuchung des Quorum Sensing war eine verstärkte Produktion von Homoserinlactonen, die angemessene Reaktion auf Streß durch hohe Wachstumsdichte, nicht mehr zu beobachten. Dies ist vergleichbar mit der Reaktion von *E.coli* auf das Ausschalten
25 von *fadL*.

Im *P.aeruginosa* - Wildtyp werden durch die Umstellung auf die Bedingungen der stationären Phase ebenfalls Mechanismen zur Abwehr von äußerem Streß hochreguliert. Bei der Untersuchung der intrazellulären Überlebensfähigkeit wurden
30 Bakterien aus dieser Wachstumsphase in die Granulozyten überführt. Fand in den Transposonmutanten mit einer Insertion in PA1288 aber keine Umstellung an die Bedingungen der stationären Phase statt, worauf die geringe Produktion an Pyoverdin und Homoserinlactonen hindeutet, so waren sie gegenüber äußerem

Streß viel anfälliger und konnten so in den Granulozyten nicht überleben. Dies deckt sich mit dem Befund, daß *P.aeruginosa* in der stationären Phase viel stärkere Abwehrmechanismen gegen die Immunantwort eines Wirts hat als in seiner logarithmischen Wachstumsphase.

5

PA1322

Phänotypische Eigenschaften

	Quorum Sensing	:	Ausgeschaltet
.0	weitere Eigenschaften	:	keine Proteasesekretion, erhöhte Resistenz gegen Peroxid

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

	Gen- Nummer	:	PA1322
.5	Bezeichnung	:	<i>pfuA</i>
	Funktion	:	möglicher TonB- abhängiger Rezeptor
	Strukturmerkmale / Homologien	:	44% Ähnlichkeit zu einem Fer- richrom- Eisenrezeptor (<i>S.paratyphi</i>)
2.0			C-terminale TonB- Rezeptor- Kas- sette
	Nukleotidsubstitutionen	:	Synonym: 1559G-A; 1613G-A)
	Länge	:	2199 Bp = 732 As.

2.5 Einfluß auf benachbarte Gene

Hinter *pfuA* liegt eine starke Terminationssequenz. Sogar bei der Sequenzierung traten in diesem Bereich große Probleme auf. Eine Auswirkung der Transposoninsertion auf die Transkription der nachfolgenden Gene ist somit auszuschließen.

3.0

weitere Untersuchungen

Eine Insertion in PA1322 führte zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Peroxiden.

weitere Informationen

TonB ist ein sezerniertes Protein, daß Eisen aus dem umgebenden Medium mit hoher Affinität bindet und *P.aeruginosa* zuführt. Wird TonB in *P.aeruginosa* PAO ausgeschaltet, so wird auch kein Pyoverdin und Pyochelin mehr produziert.

- 5 Ebenfalls sind *P.aeruginosa* PAO- Mutanten mit einem Defekt in *tonB* im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr in der Lage, immunsupprimierte Mäuse letal zu schädigen oder auch nur zu überleben. Die TonB- abhängige Eisenaufnahme ist somit für *P.aeruginosa* essentiell, um einen Wirt zu infizieren (TAKASE H ET AL. 2000)

1.0 Zusammenfassung

- In der aktuellen Literatur ist beschrieben, daß die Eisenaufnahme von *P.aeruginosa* über das Quorum Sensing reguliert wird. Bei dem hier gefundenen Transposonmutanten läuft die Regulation aber in der entgegengesetzten Richtung: Das Ausschalten eines TonB abhängigen Eisen- Rezeptors führt zum Ausschalten
 1.5 der Produktion von Homoserinlactonen. Ein solcher Regulationsmechanismus ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. In anderem Zusammenhang wurde jedoch bei einer Inaktivierung von TonB gezeigt, daß dieser Mutant ebenfalls keine Pyoverdinproduktion mehr aufweist. Die Produktion dieser Siderophore ist aber direkt über das Quorum Sensing reguliert, so daß auch hier ein Zusammenhang
 2.0 zwischen der Eisenaufnahme und der Expression des Quorum Sensings nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit beweisen zweifelsfrei die Richtung der hier vorgefundenen Regulation, in der PfuA einen regulatorischen Einfluß auf das Quorum Sensing hat.

2.5

PA1441, (PA1452, PA1104)

Phänotypische Eigenschaften

- | | | | |
|-----|------------------------|---|------|
| 3.0 | Überlebensfähigkeit : | in Granulozyten | 0,08 |
| | | in AB- Serum | 0,7 |
| | | Q _{AB} | 9 |
| | weitere Eigenschaften: | In mikroskopischen Beobachtungen er scheint der Mutant unbeweglich, in Invasivitätstests mit Epithelzellen zeigte er fast | |

- 24 -

keine Invasivität. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind verkürzte, strukturell veränderte Flagellen zu sehen.

5

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

	Gen- Nummer	:	PA1441
	Funktion	:	hypothetisches, unklassifiziertes Protein
L0			vermutlich Flagellenaufbau
	Strukturmerkmale / Homologien	:	47% Ähnlichkeit mit <i>fliK</i> (<i>S.typhimurium</i>)
	Nukleotidsubstitutionen	:	nicht-synonym: GCC GTC: A74V GTC - GCC: V82A
L5			synonym: 164G - A; 776C - T Promotor: -82C - G; -29G - A
	Länge	:	1284 Bp = 427 As.

Einfluß auf benachbarte Gene

- 20 An PA1441 schließt sich eine deutliche Terminationsstruktur an. Es ist daher nicht anzunehmen, daß andere Gene zusammen mit PA1441 transkribiert werden.

weitere Gene

- 25 Durch Ausschalten der Gene PA1452 (*flhA*) oder PA1104 (*fliI*) konnten ebenfalls Mutanten erzeugt werden, die eine verringerte Überlebensfähigkeit in Granulozyten aufweisen.

weitere Informationen

- 30 Der Aufbau von Flagellen wurde am Beispiel von *S.typhimurium* und *E.coli* detailliert untersucht. Hiernach sind die zur Synthese der Flagellen notwendigen Gene in drei großen benachbarten Operons angeordnet. Erst nachdem alle Proteine, die in einem Operon kodiert sind, vollständig synthetisiert und entsprechend ihrer Funktion in das entstehende Flagellum eingebaut sind, wird das nächste Operon abgelesen.

fliK ist dabei das letzte Gen des zweiten Operons, mit dem die Basalplatte des Flagellums vollständig aufgebaut ist. FliK hat dabei in *S.typhimurium* mindestens zwei Funktionen. Zum einen legt es die Spezifität des zentralen Kanals der Basalplatte fest und reguliert, ob Proteine für den Haken des Flagellums oder das Flagellin selber exportiert werden (MACNAB 1992). Zum anderen funktioniert es als Chaperon für die durch den Kanal geschleusten Proteine. Wird *fliK* in *S.typhimurium* ausgeschaltet, so sind die Mutanten unbeweglich und weisen entweder keine Flagellen auf oder haben anstelle korrekt zusammengesetzter Flagellen funktionslose verlängerte Flagellenhaken („Poly- Hooks“), die eine korkenzieherartige Struktur aufweisen.

Die o.g. Operonstruktur ist prinzipiell auch in *P.aeruginosa* zu finden. Allerdings ist das letzte Gen des zweiten Operons (*fliK*) durch eine Insertion von 372 kbp vom Rest des Operons getrennt, das nun mit *fliJ* endet. *fliK* selber liegt weiterhin direkt vor dem 3. Operon zur Flagellensynthese, wird von diesem aber durch eine deutliche Terminationsschleife getrennt.

FliI und FlhA bilden zusammen mit FliK notwendige Bestandteile des Flagellenexportsystems. FlhA ist dabei eine strukturelle Komponente, FliI ermöglicht unter ATP- Verbrauch den Export der jeweiligen Proteine (MINAMINO, MACNAB, 1999). Die Lage von FliK, FliI und FlhA im Flagellum ist in Fig. 2 dargestellt.

Figur 2 zeigt das Sekretionssystem von *P. aeruginosa*. Die betroffenen Gene sind in der Abbildung dunkelgrau markiert. Alle drei hier adressierten Gene sind notwendig für die Sekretion von Pathogenitätsfaktoren durch das Flagellum. Von allen ist nachgewiesen, daß sie für das intrazelluläre Überleben von *P. aeruginosa* notwendig sind.

weitere Untersuchungen

Bei den Untersuchungen zur Invasivität in Epithelzellen (Kap. 3.5.1.) zeigten Mutanten mit einer Transposoninsertion in *fliK* die geringste Invasivität. Ebenfalls fiel bei der Beobachtung im Mikroskop auf, daß sie vollständig unbeweglich waren. Zur genaueren Untersuchung wurden daher elektronenmikroskopische Aufnahmen ihrer Flagellen angefertigt. Auf diesen Aufnahmen war zu sehen, daß die Flagellen bei ca. 90% der PA1441 Transposonmutanten deutlich verkürzt sind, die restlichen

verfügen über gar kein Flagellum. In *S.typhimurium* führt das Ausschalten von *fliK* zur Bildung verlängerter Hakenstrukturen. Um entscheiden zu können, ob die gesehenen Strukturen verkürzte Flagellen oder verlängerte Haken sind, wurden die Flagelline fixierter Bakterien (*P.aeruginosa* TB_w, *P.aeruginosa* PA1441- knock out und
5 *E.coli* DH5α oder DH5a mit einem spezifischen Anti- Flagellin- Antikörper (gegen Flagellin Typ b) detektiert.

FlhA- Mutanten besitzen keine Flagellen, *fliI*- Mutanten verfügen zwar über prinzipiell funktionelle Flagellen, diese sind jedoch nicht fest in der Membran integriert und gehen schnell zusammen mit dem angeschlossenen Exportsystem
10 verloren.

Zusammenfassung

Die Expression von PA1441 ist essentiell für die Motilität von *P.aeruginosa*.
15 Allerdings wird im Gegensatz zu *E.coli* und *S.typhimurium* bei Ausschalten des Gens auch weiterhin ein verkürztes Flagellum aufgebaut. In *P.aeruginosa* ist *fliK* vom Rest des zweiten Operons zur Flagellensynthese durch eine große Insertion getrennt. Die Verringerung der intrazellulären Überlebensfähigkeit von *P.aeruginosa* durch Ausschalten der Gene PA1104, PA1441 und PA1452 legt nahe,
20 daß das Flagellenexportsystem essentiell für das Überleben der Bakterien in Phagozyten ist. Dies entspricht den Erfahrungen aus *Yersinia pseudotuberculosis*, einem anderen intrazellulär überlebensfähigen Pathogen, bei dem durch das Flagellenexportsystem sezernierte Proteine essentiell für die intrazelluläre Persistenz sind (YOUNG ET AL., 1999). Da die Exportsysteme von *Pseudomonas* und
25 *Yersinia* hoch homolog sind, ist eine gleichartige Funktion zur Sekretion von Pathogenitätsfaktoren eine hinreichende Erklärung für die Notwendigkeit dieser Gene zum Überleben in Granulozyten.

PA1572**Phänotypische Eigenschaften**

5	Überlebensfähigkeit :	in Granulozyten	0,06
		in AB- Serum	1,2
		Q _{AB}	20
	Quorum Sensing:	verringerte Produktion v. Autoinducern	
	weitere Eigenschaften:	verringerte Proteasesekretion	

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

.0	Gen- Nummer :	PA1572
	Funktion :	Hypothetisches Protein, unklassifiziert
	Strukturmerkmale / Homologien :	56% Ähnlichkeit zu einem 377 As. langen hypothetischen Protein bei
.5		<i>Pyrococcus horikoshii</i> .
	Nukleotidsubstitutionen :	nicht- synonym: ACC - GCC: T354A synonyme: 1007C - G
	Länge :	1146 Bp = 382 As.

20 Einfluß auf benachbarte Gene

Die letzten 20 Basen der kodierenden Sequenz von PA1572 bilden zusammen mit der nachfolgenden Sequenz eine typische Terminationsstruktur. Es ist daher nicht anzunehmen, daß weitere Gene zusammen mit PA1572 transkribiert werden.

25 weitere Untersuchungen

Es wurde gezeigt, daß die verringerte Sekretion von Proteasen und Homoserinlactonen durch Inkubation mit *P.aeruginosa* TB_{wt} bis fast auf die Ausgangswerte des Wildtyps gesteigert werden konnte.

30 Zusammenfassung

Bei dem Transposonmutanten mit einer Insertion in PA1572 ist das ausgeschaltete Gen unklassifiziert, so daß weder Bindungspartner noch Substrate bekannt sind. Dennoch ist dies eines der interessantesten Gene, die in diesen Untersuchungen

- 28 -

gefunden wurden. Während die Serumresistenz gegenüber dem Wildtyp unverändert, vielleicht sogar etwas erhöht ist, überleben fast keine PA1572- knock out Mutanten eine Phagozytose durch Granulozyten. Ebenfalls zeigen sie eine stark verringerte Produktion von Homoserinlactonen, aber keinen Totalausfall. Durch
 5 Zugabe von Autoinducern konnte in Mutanten mit einer Insertion in PA1572 die eigene Produktion dieser Moleküle induziert werden. Dies läßt den Schluß zu, daß durch die Transposoninsertion weder Aufnahme noch Erkennung oder Produktion von Homoserinlactonen, sondern deren Regulation beeinflußt worden ist.

.0

PA1992**Phänotypische Eigenschaften**

Überlebensfähigkeit :	in Granulozyten	0,4
	in AB- Serum	0,4
	Q _{AB}	1
weitere Eigenschaften:	deutlich erhöhte Invasivität in Epithelzellen und erhöhte Adhärenz	

.5

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer :	PA1992
Funktion :	möglicher 2-Komponenten -Sensor
Strukturmerkmale / Homologien :	56% Ähnlichkeit mit unveröffentlichtem <i>flhS</i> von <i>Paracoccus denitrificans</i> (nur C-terminal 75% des ORF)
	Strukturmotive einer Histidinkinase und eines Response- Regulator Re ceivers
Nukleotidsubstitutionen :	nicht- synonym: CTG - TTG: L326F im Promotor: -75 C - T
Länge :	1694 Bp = 565 As.

20

25

30

Einfluß auf benachbarte Gene

PA1992 ist das letzte Gen einer möglichen polycistronischen Genkassette. Diese schließt ohne Terminationsschleife, allerdings sind auf den folgenden 8 kB die Gene auf dem Gegenstrang kodiert. Ein cis- Effekt der Transposoninsertion ist somit
5 unwahrscheinlich.

weitere Informationen

Im PAO- Genom existieren zwei paraloge Gene zu PA1992. PA1976 ist etwas länger, weist aber einige sehr homologe Bereiche auf. Das zweite paraloge Gen ist
10 PA3271. Beide Gene sind funktionell als 2-Komponenten - Sensoren eingeordnet. In den Datenbanken ist keine weitere Information zur Funktion von PA1992 oder *flhS* zu erhalten.

weitere Untersuchungen

Bei der Untersuchung des intrazellulären Überlebens in Granulozyten zeigte der
15 Mutant 14B2 meistens eine Überlebensrate, die deutlich über der des Durchschnitts lag. Auffällig waren aber vor allem die Ergebnisse der Invasivitätstests mit Epithelzellen (Kap. 3.5.1.). Hierbei zeigte der Transposonmutant eine deutlich höhere Adhärenz und eine 10- 20 fach höhere Invasivität in Epithelzellen als der
20 Wildtyp.

Zusammenfassung

Bei PA1992 handelt es sich um eine Histidinkinase. Dieses Strukturmotiv deutet auf eine Funktion als Regulator in einer Signalkaskade hin. Durch das Ausschalten des
25 Gens PA1992 wurde die Adhärenz und Invasivität in Epithelzellen um mindestens den Faktor 10 gesteigert. Die genomische Umgebung läßt keinen cis - Effekt zu. Die phänotypischen Veränderungen sind somit dem Ausschalten des Gens PA1992 direkt zuzuordnen.

PA2591**Phänotypische Eigenschaften**

Quorum Sensing	:	Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften	:	keine Proteasesekretion

5

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer	:	PA2591
Funktion	:	Transkriptionsregulator
Strukturmerkmale / Homologien	:	46% Ähnlichkeit mit DMSO - Reduktase - Regulatorprotein DorX (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>) Signatur der LuxR- Familie
Länge	:	807 Bp = 268 As.

10

15 Einfluß auf benachbarte Gene

Hinter PA2591 liegt eine mögliche Terminationsschleife. Diese Struktur ist allerdings nicht besonders stark ausgeprägt. Eventuell werden daher die nachfolgenden Gene PA2590 und PA2589 (beides hypothetische ORFs) von der RNA- Polymerase mittranskribiert.

20

Zusammenfassung

Das identifizierte Gen PA2591 gehört zur Familie der LuxR- Regulatoren, wie z.B. auch Vfr, einem bekannten Regulator des Quorum Sensings. Bei allen gram-negativen Bakterien, deren Quorum Sensing bisher untersucht wurde, gehört
 25 mindestens ein LuxR- verwandtes Protein zum Regulationssystem des Quorum Sensings. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß das Ausschalten von PA2591 zum vollständigen Ausfall des Quorum- Sensings in *P.aeruginosa* TB führte. Dies bedeutet, daß auch dieser Regulator in die Steuerung des Quorum Sensing eingreift. Bisher war als übergeordneter Regulator nur Vfr bekannt. Der
 30 Funktion des gefundenen LuxR- Regulators war bisher unbekannt. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, daß durch Transposoninsertion in dieses Gen weder kurzkettige noch langkettige aliphatische Homoserinlactone von dem Transposonmutanten produziert werden konnten. Dies bedeutet, daß dieser bisher

funktionell uncharakterisierte Regulator in einer ähnlich zentralen Position in die Produktion der Autoinducer eingreift wie Vfr, bislang aber übersehen wurde.

PA3344

5 Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit :	in Granulozyten	0,05
	in AB- Serum	0,9
	Q _{AB}	18

weitere Eigenschaften: erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Peroxi-
den

10

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer : PA3344

Bezeichnung : *recQ*

15

Funktion : ATP- abhängige DNA-Helicase

Strukturmerkmale / Homologien : DEAD- Box Unterfamilie der ATP-
abhängigen Helicasen, für Helicasen
typischer konservierter C- Terminus,
HRDC- Domäne

20

Nukleotidsubstitutionen : synonym: 95A-C; 337A-G ; 382C-T

Länge : 2138 Bp = 713 As.

Einfluß auf benachbarte Gene

25 4 weitere Gene unbekannter Funktion sind im Anschluß an *recQ* in gleicher Leserichtung auf dem PAO- Chromosom lokalisiert. Ein cis- Effekt wäre theoretisch denkbar, durch die Ergebnisse der weiterführenden Untersuchungen erscheint aber *recQ* tatsächlich für den beobachteten Phänotyp verantwortlich zu sein.

30 weitere Informationen

Die aus der PAO- Datenbank erhaltene Funktionsvorhersage lautet: DNA -
Replikation, -Rekombination, -Modifikation und -Reparatur

weitere Untersuchungen

Unter normalen Wachstumsbedingungen oder bei Inkubation mit AB- Serum zeigt ein Transposonmutant mit einer Insertion in *recQ* keinen signifikant veränderten Phänotyp. Allerdings führt das Ausschalten von RecQ zu einer signifikanten Verringerung der intrazellulären Überlebensfähigkeit in den Granulozyten und zu einer deutlich erhöhten Sensibilität gegenüber Peroxiden. Die Funktion dieses Proteins muß daher in der Reparatur der unter diesen Umständen induzierten DNA-Schäden liegen.

L0 Zusammenfassung

AB- Serum schädigte die Mutanten nicht stärker als den Wildtyp. Nur die Fähigkeit zum intrazellulären Überleben nach der Phagozytose durch die Granulozyten war stark vermindert. Das Ausschalten von *recQ* erhöhte die Sensitivität gegenüber dem oxidativen Streß in den Granulozyten. Dies ist durch das fehlende Wachstum auf peroxidhaltigem Vollmedium bestätigt worden. Vermutlich ist *recQ* an der Reparatur von Schäden beteiligt, die durch oxidativen Streß an der DNA auftreten.

PA4621**Phänotypische Eigenschaften**

20	Überlebensfähigkeit	:	in Granulozyten	0,2
			in AB- Serum	0,2
			Q_{AB}	1
	Quorum Sensing	:	Ausgeschaltet	
25	weitere Eigenschaften	:	keine Proteasesekretion, erhöhte	
			Empfindlichkeit gegenüber Peroxiden	

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

	Gen- Nummer	:	PA4621
	Funktion	:	mögliche Oxidoreduktase
30	Strukturmerkmale / Homologien	:	Motive einer Aldehydoxidase und Xanthindehydrogenase am C- Terminus, 2 Transmembranhelices vorherge-

- 33 -

sagt

Nukleotidsubstitutionen : nicht- synonym: CTG - TTG: L326F
im Promotor: -75 C - T

Länge : 2832 Bp = 944 As.

5

Einfluß auf benachbarte Gene

Hinter PA4621 befindet sich keine Terminationsstruktur. Das Gen bildet zusammen mit den drei folgenden Genen PA4620 (4-Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktase), PA4619 (membrangebundene Alkoholdehydrogenase Cytochrom c Untereinheit) und PA4618 (unbekannte Funktion) eine polycistronischen Genkassette.

10

Zusammenfassung

Der Mutant mit einer Insertion in PA4621 zeichnete sich durch einen Defekt im Quorum Sensing und eine verringerte Überlebensfähigkeit in AB- Serum aus, wodurch er in den Selektionsexperimenten mit Granulozyten auffiel. Letzteres ist auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem oxidativem Streß in den Phagosomen zurückzuführen. Die in den Datenbanken vorhandenen Informationen über das ausgeschaltete Gen enthalten keine Angaben über ein eventuelles Substrat oder weitere Untersuchungsergebnisse zu dem kodierten Protein.

15

20

PA5040

Phänotypische Eigenschaften

Überlebensfähigkeit :	in Granulozyten	1,0
	in AB- Serum	2,7
	Q _{AB}	2,7

25

weitere Eigenschaften: Überlebte von allen untersuchten Transposonmutanten bei Inkubationen mit Granulozyten am besten.

30

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer	:	PA5040
Bezeichnung	:	<i>pilQ</i>

- 34 -

Funktion: mögliche Oxidoreduktase

Strukturmerkmale / Homologien : Notwendig zum Aufbau von TypIV-

Fimbrien. Bildet eine basale Komponente, durch die die Pili- Proteine ausgeschleust werden. Typ IV- Fimbrien sind notwendig für Motilität ("Twitching motility") und Kontakt zu Oberflächen (HOBBS & MATTICK 1993)

Nukleotidsubstitutionen : synonym: 488C-T; 743C-T; 803T-C

Länge : 2145 Bp = 714 As.

Einfluß auf benachbarte Gene

pilQ ist das letzte Gen der polycistronischen Genkassette *pilMNOPQ*. Direkt im Anschluß sind ohne offensichtliche Terminationsstrukturen weitere Gene kodiert, die eine Funktion im Aminosäuremetabolismus (aromatische Aminosäuren) oder der Häm- Synthese haben.

Weitere Untersuchungen

Der Transposonmutant, bei dem das Transposon in das Gen *pilQ* (PA1322) inseriert wurde, weist eine deutlich erhöhte Serumstabilität auf. PilQ ist ein Bestandteil der TypIV- Fimbrien von *P.aeruginosa* (MARTIN ET AL. 1993).

Zusammenfassung

Die hohe Überlebensrate von *pilQ*- Transposonmutanten läßt sich in erster Linie auf eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Blutserum zurückführen. Die eventuell zusammen mit *pilQ* von RNA- Polymerasen abgelesenen Gene zur Aminosäure- oder Häm- Synthese haben keinen entscheidenden Einfluß auf die Serumstabilität von Bakterien. Die beobachteten Veränderungen im Phänotyp sind daher auf das Fehlen des entsprechenden Genprodukts zurückzuführen. Durch das Ausschalten von PilQ scheint es kompensatorisch zu einer erhöhten Produktion von Exopolysacchariden zu kommen, die die Bakterien gegen das Komplementsystem abschirmen.

PA5349**Phänotypische Eigenschaften**

5	Überlebensfähigkeit :	in Granulozyten	0,05
		in AB- Serum	0,4
		Q_{AB}	8
	Quorum Sensing :	Ausgeschaltet	
	weitere Eigenschaften :	keine Proteasesekretion, erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Peroxiden	

10

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

15	Gen- Nummer :	PA5349
	Funktion :	mögliche Rubredoxin Reduktase
	Strukturmerkmale / Homologien :	59% Ähnlichkeit mit Rubredoxin Reduktase von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> partielle Signatur einer Aromaten-Hydroxylase (Flavoproteinmonooxygenase), Strukturmerkmal einer Pyridinnukleotid - Disulfidoxidoreduktase
20	Nukleotidsubstitutionen :	synonym: 893G - C; 1055T - C
	Länge :	1155 Bp = 384 As.

25 Einfluß auf benachbarte Gene

Die Gene vor PA5349 kodieren für verschiedene Enzyme des Kohlenstoffkatabolismus. PA5350 und PA5351 für zwei Rubredoxin- ORFs, das auf PA5349 folgende Gen (PA5348) kodiert für ein mögliches DNA- bindendes Protein, dem (in den Datenbanken) eine Funktion in der DNA- Replikation, - Modifikation, -
 30 Rekombination oder - Reparatur zugewiesen wird. Alle diese Gene (von PA5355 bis 5347) werden vermutlich in einem Zuge von der RNA- Polymerase abgelesen.

weitere Informationen

Rubredoxin Reduktase ist eine Flavoproteinioxidoreduktase. Sie arbeitet zusammen mit Rubredoxin und oxidiert so aliphatische Kohlenwasserstoffe mit Sauerstoff zu der entsprechenden Carbonsäure, die dann von anderen Enzymen weiter
5 metabolisiert werden kann. Rubredoxin Reduktase hat allerdings auch noch eine weitere Funktion: Sie wirkt in einigen anaeroben Bakterien zusätzlich als Schutz gegen oxidativen Streß (LUMPPIO HL ET AL.,2001). Auch bei Bakterien mit aerobem Stoffwechsel können Rubredoxin und Rubredoxin Reduktase ein wichtiger Schutz gegen oxidativen Streß sein. So können sie z.B. in *E.coli* die Superoxiddismutase
10 ersetzen (PIANZZOLA MJ ET AL. 1996).

In *P.aeruginosa* wird die Expression zweier Superoxiddismutasen und einer Katalase direkt über das LasR/LasI- System reguliert. Das Quorum Sensing ist somit auch in diesem Bakterium notwendig zur Kontrolle von oxidativem Streß. Mutanten mit einem Defekt in einem der beiden Regulationssysteme zeigen eine
15 verringerte Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid (HASSETT DJ ET AL. 1999), wie es auch hier beim Ausschalten der Rubredoxin- Reduktase zu beobachten war.

weitere Untersuchungen

Entsprechend den Untersuchungen bei anderen wurde auch der Mutant mit einer
20 Transposoninsertion in PA5349 auf seine Sensibilität gegenüber Peroxiden überprüft. Auch dieser Mutant zeichnete sich durch eine deutlich verringerte Resistenz gegenüber oxidativem Streß aus.

Zusammenfassung

25 Der Transposonmutant mit einer Insertion in PA5349 zeigte in der Inkubation mit Granulozyten eine deutlich verringerte Überlebensfähigkeit. Dies kann - ähnlich wie bei anderen Mutanten mit dem Defekt in der Helikase - auf Grundlage der Ergebnisse der Inkubation auf peroxidhaltigem Vollmedium, direkt auf eine verringerte Resistenz gegenüber oxidativem Streß zurückgeführt werden. Es ist
30 bekannt, daß in *P.aeruginosa* an der Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid in der stationären Phase mindestens zwei Superoxiddismutasen und eine Katalase beteiligt sind (HASSETT DJ ET AL. 1999). In diese Kategorie könnte auch die funktionell sehr ähnliche Rubredoxinreduktase einzuordnen sein. Die Entgiftung von

Sauerstoff hat für *P.aeruginosa* eine entscheidende Bedeutung. Der Ausfall eines der Entgiftungsmechanismen kann eventuell die Ursache dafür sein, daß die phagozytierten Mutanten mit einem Defekt in PA5349 nicht mehr intrazellulär in Granulozyten überleben können.

- 5 Weiterhin produzierte der Mutant mit der Insertion in PA5349 keine Homoserinlactone. Vermutlich ist die Rubredoxin Reduktase notwendig, um aliphatische hydrophobe Verbindungen so zu oxidieren, daß sie im Fettsäuremetabolismus verarbeitet werden können. Der Ausfall dieses Enzyms könnte die Synthese von aliphatischen Homoserinlactonen beeinflussen, da durch
 10 den Knock- out keine oder nur wenige aliphatischen Seitenketten für die AHL-Synthese in den Mutanten vorhanden sind. (siehe auch PA1288)

PA5415

Phänotypische Eigenschaften

- Quorum Sensing: keine Produktion von kurzkettigen AHL, nur
 15 sehr geringe Produktion von langkettigen AHL.
 weitere Eigenschaften: Proteasesekretion nicht ausgeschaltet

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

- | | | |
|----|---------------------------------|--|
| 20 | Gen- Nummer : | PA5415 |
| | Funktion : | Serinhydroxymethyltransferase
(Aminosäurebiosynthese und
-metabolismus: Gly-, Ser-, Thr- Meta-
bolismus, Lys- Synthese, CH ₄ -
Metabolismus und C ₁ - Reservoir) |
| 25 | Strukturmerkmale / Homologien : | 82% Ähnlichkeit mit Serinhydroxy-
methyltransferase aus <i>E.coli</i> .
Strukturmotive einer Aminotransfer-
ase Klasse II und eine Bindungsstelle
für Pyridoxalphosphat. |
| 30 | Nukleotidsubstitutionen : | nicht-synonym: CGG - CAG : R76Q
GGG - GCC : G304A
synonym: 161C - T; 228G - A ; 251T
- C; |

- 38 -

287G - A; 308A - G; 416A - C;
770T - C; 935T - C

Länge : 1254 Bp = 417 As.

5

Einfluß auf benachbarte Gene

Hinter PA5415 existieren mindestens 4 verschiedene Möglichkeiten, um Terminationsstrukturen auszubilden. Möglicherweise handelt es sich dabei um Proteinbindungsstellen, durch die die Transkription und Translation der folgenden
10 Gene (Sarkosin- Oxidase und Proteine des C₁- Metabolismus) reguliert werden können.

Zusammenfassung

Eine inhaltliche Verbindung der Serinhydroxymethyltransferase zum Quorum
15 Sensing ist der aktuellen Literatur nicht zu entnehmen. Es existieren allerdings Ergebnisse aus *E.coli*, wonach diese Bakterien unter Streß ihr Expressionsmuster ändern. Die Serinhydroxymethyltransferase wird in diesem Fall zusammen mit dem Protein FadL und dem Acyl- Carrier- Protein deutlich verstärkt produziert (OHBA ET AL. 1997). Ein Mutant mit der Transposoninsertion in einem FadL entsprechenden
20 Protein wurde im Zuge der Untersuchungen gefunden – PA1288. Auch dieser Mutant zeigt einen Defekt im Quorum Sensing und in der Reaktion auf Streßfaktoren. Der einzige bekannte funktionelle Zusammenhang besteht darin, daß die Serinhydroxymethyltransferase eine Funktion im C₁- Metabolismus hat. S-Adenosylmethionin ist sowohl ein internes Reservoir für den C₁- Metabolismus,
25 andererseits aber auch für die Produktion von Homoserinlactonen notwendig. Eventuell kommt es durch das Ausschalten der Serinhydroxymethyltransferase zu einer Verringerung der Konzentration an verfügbarem S-Adenosylmethionin und so zu einem Mangel an Homoserin zum Aufbau der Autoinducer.

30

Seq. ID 1**Phänotypische Eigenschaften**

5	Überlebensfähigkeit :	in Granulozyten	0,3
		in AB- Serum	0,15
		Q _{AB}	0,5
	Quorum Sensing :	Ausgeschaltet	
	weitere Eigenschaften :	keine Proteasesekretion	

.0 Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer: Nicht im PAO- Genom vorhanden

weitere Informationen

- .5 Auf Proteinebene existiert eine geringe Ähnlichkeit ($2 \cdot 10^{-19}$) zwischen der sequenzierten Region und einem hypothetischen ORF von *Salmonella typhi*. Auf Nukleotidebene gab es keine Homologien.

weitere Untersuchungen

- .20 In einer Southern- Hybridisierung wurde die mit *Pst*I- verdaute genomische DNA verschiedener *P.aeruginosa* - Isolate mit der flankierenden Sequenz der Transposoninsertion hybridisiert. Die Seq. ID1 ist nicht nur in *P.aeruginosa* TB sondern auch in den beiden untersuchten Isolaten *P.aeruginosa* CSGB8 und SG17M vorhanden. Mit *P.aeruginosa* PAO zeigte sich erwartungsgemäß kein
 .25 Signal.

Zusammenfassung

- Die unbekannte Sequenz ist keine klonspezifische DNA von *P.aeruginosa* TB, da sie auch in zwei Isolaten des Klon C (*P.aeruginosa* SG17M und CSGB8)
 .30 vorkommt. Eine Transposoninsertion in diesem Bereich, der in *P.aeruginosa* PAO nicht existiert, schaltete das Quorum Sensing von *P.aeruginosa* TB vollständig aus. Dies bedeutet, daß das Quorum Sensing in diesen Bakterien teilweise anders reguliert wird. Außerdem werden in der unbekannten DNA- Sequenz - zumindest in

einer Subpopulation von *P.aeruginosa* - zusätzliche entscheidende Faktoren für die Expression des Quorum Sensings kodiert, die bei Untersuchungen des genetischen Referenzstammes PAO nicht gefunden werden.

5

Seq.ID 2**Phänotypische Eigenschaften**

Quorum Sensing	:	Ausgeschaltet
weitere Eigenschaften	:	keine Proteasesekretion

10

Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)

Gen- Nummer	:	Nicht im PAO- Genom vorhanden
-------------	---	-------------------------------

weitere Untersuchungen:

15 Wie bei dem Mutanten mit einer Insertion in Seq. ID 1 wurde auch hier in einer Southern- Hybridisierung die mit *Pst*I- verdaute genomische DNA verschiedener *P.aeruginosa* - Isolate mit der flankierenden Sequenz der Transposoninsertion hybridisiert.

Die unbekannte DNA- Sequenz ist nicht nur in *P.aeruginosa* TB sondern auch in
20 den meisten untersuchten *P.aeruginosa* Isolaten vorhanden. Mit *P.aeruginosa* PAO zeigte sich erwartungsgemäß kein Signal. Bei einem Sequenzabgleich mit Hilfe von BLASTN zeigte sich eine Sequenzidentität von ca. 80% zu Seq. ID 3.

Zusammenfassung

25 Wie bei Seq. ID 1 ist auch diese unbekannte Sequenz keine klonspezifische DNA von *P.aeruginosa* TB, da sie auch in anderen Isolaten vorkommt. Eine Transposoninsertion in diesem Bereich, der in *P.aeruginosa* PAO nicht existiert, schaltete das Quorum Sensing von *P.aeruginosa* TB vollständig aus. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß das Quorum Sensing von *P.aeruginosa* TB - und
30 eventuell auch von anderen *P.aeruginosa*- Isolaten - durch zusätzliche Faktoren reguliert wird, die von den Untersuchungen bei PAO unbekannt sind.

Seq. ID 3**Ausgeschaltetes Gen (lt. *P.aeruginosa* Genomprojekt)**

Gen- Nummer : Nicht im PAO- Genom vorhanden

5

Zusammenfassung:

Seq. ID 3 zeigt eine 80% ige Identität auf Nukleotidebene zu Seq. ID 2, repräsentiert aber im Gegensatz dazu die Sequenz des vollständigen Gens. Dies ist ein Beispiel aus einer Genfamilie, die in mehr als 60% aller *P. aeruginosa* Isolate und in vielen anderen gram- negativen Bakterien vorhanden ist, im sequenzierten Stamm PAO aber fehlt. Die Mitglieder dieser Genfamilie haben untereinander auf Nukleotidebene eine Ähnlichkeit von ca. 80%, auf Proteinebene meist noch deutlich höher.

15

Zusammenfassung der Ergebnisse**Intrazelluläre Überlebensfähigkeit in Granulozyten**

Von den Erfindern wurden mehr als 1000 Transposonmutanten auf ihre intrazelluläre Überlebensfähigkeit in Granulozyten untersucht. Diejenigen *P.aeruginosa*-Mutanten mit den deutlichsten phänotypischen Abweichungen wurden gesammelt und erneut untersucht. Bei den auffälligsten der so in ihrer phänotypischen Abweichung bestätigten Bakterien wurde genauer differenziert und quantifiziert, zu welchen Teilen die gemessenen geringen Überlebensraten auf eine geringe Überlebensfähigkeit in Granulozyten zurückzuführen sind und welchen Anteil eine Sensibilität gegen Blutserum an dem gemessenen Effekt hat. Weiterhin wurden die identifizierten Transposonmutanten auf ihre Invasivität in Epithelzellen untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die intrazelluläre Überlebensfähigkeit in Granulozyten und die Invasivität eines Bakteriums in Epithelzellen nicht miteinander verbundene phänotypische Eigenschaften sind.

30

Die Sequenzierungen der flankierenden DNA- Bereiche der genomisch inserierten Transposons zeigten, daß in den meisten *P.aeruginosa* TB-Transposonmutanten, die das Selektionsexperiment nicht überlebt hatten, Gene ausgeschaltet wurden, die auch im *P.aeruginosa* PAO- Genom vorkommen.

Bei Transposonmutanten, deren Sensitivität gegenüber Blutserum verändert war, scheint die Ursache eine Modifikation in der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix oder des Aufbaus der äußeren Zellmembran zu sein. Die Ursachen für die verminderte Überlebensfähigkeit in Granulozyten lassen sich zum einen auf Defekte in der Abwehr von oxidativem Streß oder der Reparatur von oxidativen Schäden an der DNA zurückführen. Zum anderen wurden Gene des Flagellenexportsystems gefunden, deren Ausschalten einerseits den Flagellenaufbau störte, andererseits aber auch die intrazelluläre Überlebensfähigkeit in Granulozyten und die Invasivität in Epithelzellen stark verminderte. Dies liegt in einer doppelten Funktion dieses Exportsystems begründet. Neben seiner Funktion für den geordneten Flagellenaufbau wird es ebenfalls zu Sekretion von Pathogenitätsfaktoren benötigt, die *P. aeruginosa* das intrazelluläre Überleben ermöglichen.

Quorum sensing

Die Untersuchung auf die Funktionstüchtigkeit des Quorum Sensing erfolgte durch Inkubation der *P.aeruginosa*- Transposonmutanten mit einem *E.coli* - Detektorstamm. Dieser trug ein Plasmid, auf dem eine Luciferase hinter einem Promotor kodiert war, an den nur bei Anwesenheit von Homoserinlactonen eine RNA- Polymerase binden konnte. Hierfür wurde jeder einzelne Mutant in Mikrotiterplatten separat untersucht . Die so identifizierten Transposonmutanten mit einem deutlichen Defekt in der Produktion von lang- und kurzkettigen aliphatischen Homoserinlactonen (AHL) wurden auf zwei neu entwickelten Selektionsmedien auf

ihre Proteaseaktivität untersucht. Wie zu erwarten war, zeigte sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Produktion von AHL und der Sekretion von Proteasen.

- 5 Die gefundenen Gene kodieren für eine Vielzahl verschiedener Proteine, in der Majorität jedoch für Regulatoren mit zumeist bisher unbekannter Funktion. Eine zweite Gruppe von Genen ist mit dem Fettsäuremetabolismus assoziiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß diese Genprodukte für die Synthese der aliphatischen Seitenketten der Homoserinlactone essentiell sind. Weiterhin wurde
- 10 ein TonB- abhängiger Eisenrezeptor gefunden, dessen Inaktivierung zu einem Totalausfall des Quorum Sensing führte. Bisher war nur bekannt, daß das Quorum Sensing die Eisenaufnahme reguliert, der umgekehrte Mechanismus war bisher noch nicht beschrieben worden. Weiterhin wurde ein Protein identifiziert, das strukturelle Ähnlichkeiten mit einer β - Lactamase aufweist und dessen Inaktivierung
- 15 die Menge der freien Homoserinlactone in der stationären Wachstumsphase erhöht und somit die Funktion einer Homoserinlactonase hat. Zusätzlich wurden Transposoninsertionen in zwei weiteren DNA- Sequenzen gefunden, die nicht aus der Sequenzierung von *P.aeruginosa* PAO bekannt sind, aber keine klonspezifische DNA des Stammes TB sind, sondern auch bei anderen *P. aeruginosa* Isolaten
- 20 gefunden wurden. Mit einer Ausnahme waren alle gefundenen Gene bisher nicht dem Quorum Sensing zugeordnet worden. Dies deutet darauf hin, daß das bisher existierende Regulationsmodell für die Produktion von AHL sehr lückenhaft ist. Das Fehlen zweier DNA- Sequenzen in *P.aeruginosa* PAO, deren Inaktivierung zu einem Defekt im Quorum Sensing des untersuchten Transposonmutanten führte, war ein
- 25 überraschender Befund und deutet darauf hin, daß die AHL- Produktion verschiedener *P.aeruginosa* - Stämme unterschiedlich reguliert sein kann. In PAO fehlen DNA- Sequenzen, die bei mehreren anderen *P.aeruginosa*- Stämmen vorkommen und dort eine essentielle Funktion für die Regulation und Produktion der Homoserinlactone haben. Die aus der Untersuchung von *P.aeruginosa* PAO
- 30 erhaltenen Informationen werden somit das Quorum Sensing in anderen *P.aeruginosa*- Stämmen nur lückenhaft beschreiben können.

Experimentalteil

Erzeugung der Transposonmutanten

5 Bakterienstämme

Escherichia coli

DH5: F^- , $\phi 80$, $m80lacZ\Delta M1S$, $\Delta(lacYZA-argF)_{U169}$, $recA1$, $endA1$, $hsdR17$
 L0 $(r_K^- ; m_K^+)$, $supE44$, λ , thi^- , $gyrA$, $relA1$
 Verwendung: Lagerung von pTnMod-OGm und Donorstamm
 in triparentaler Konjugation

HB101: F^- , $leuB6$, $proA2$, $recA13$, $thi-1$, $ara-14$, $lacY1$, $galK2$, $xyl-5$, $mtl-1$,
 L5 $rpsL20$, $supE44$, $hsdS20$ ($r_B^- ; m_B^-$)
 Verwendung: Als Träger des Plasmides pRK2013; Helferstamm in
 triparentaler Konjugation

Pseudomonas aeruginosa TB: Serotyp: 4
 20 Pyocintyp: 1h
 Phagenlysotypie: F8, M4, PS2, PS24, PS31,
 352, 46b/2, 1214, Col21, F7, F10, PS21, PS73
 Ein Plasmid konnte nicht nachgewiesen
 werden.

25

Vektoren

pTnMod-OGm

Der Vektor pTnMod-OGm wurde von DENNIS & ZYLSTRA (1998) erstmalig beschrieben. Es handelt sich hierbei um ein sog. Plasposon mit einem mini-*Tn5* (mit einer
 30 Gentamicinresistenz) und einem *oriTRP4* zum konjugativen Transfer. Bei der
 Transposition verbleibt die Transposase auf dem Plasmid. Zusätzlich umfaßt die
 transponierte Sequenz bei pTnMod-OGm auch den Replikationsursprung des
 Plasmides. Dies bedeutet, daß das Restplasmid nach erfolgter Transposition nicht
 mehr repliziert werden kann und somit verloren geht. Der verwendete Replikations-

ursprung *oriR* pMB1 ist zudem zwar in den meisten *E.coli* - Stämmen, nicht aber nicht in *P.aeruginosa* stabil exprimierbar. Ein weiterer Vorteil dieses Vektors liegt darin, daß somit eine erneute Mobilisierung der flankierenden Bereiche des inserierten mini- Transposons als Plasmid möglich wird (Plasmid rescue).

- 5 In diesem Plasmid wurde eine optimierte Signalsequenz (V_{40} ; V=A,G,C) flankierend zum Replikationsursprung in die *KpnI*- Schnittstelle des pTnMod-OGm ligiert. Das Plasmid eignet sich somit zur Generierung von Mutanten mit spezifischen Signalsequenzen.

10 **pRK2013**

pRK2013 ist ein sog. Helferplasmid. Es kodiert für sämtliche Gene, die für eine Konjugation notwendig sind (*tra* und *mob*). Mit seiner Hilfe sind andere Plasmide, die einen RP4- *oriT* besitzen, mobilisierbar, auch wenn der Donor- Stamm selbst nicht über die zur Konjugation notwendigen Gene verfügt (FIGURSKI D & HELINSKI D
15 1979).

Anzucht von Bakterien

Das meistverwendete Kulturmedium zur Bakterienanzucht war Luria- Bertiani- (LB-) Medium. Zumeist erfolgte die Anzucht der Bakterien aus Einzelkolonien in 5 ml LB
20 (37°C, 250 rpm, 12- 16 h). Als lagerfähige Kultur oder zur Selektion diente LB- Agar mit einem entsprechenden Antibiotika- Zusatz.

Selektionsmedien:

	<i>E.coli</i> DH5α pTnMod-OGm	LB + 25 µg/ml Gentamicin
	<i>E.coli</i> HB101 pRK2013	LB + 50 µg/ml Kanamycin
25	<i>P.aeruginosa</i>	LB + 50µg/ml Gentamicin und M9(Glycerol) + 50µg/ml Gentamicin

Triparentale Konjugation

Bei diesem Verfahren wird ein mobilisierbares Plasmid mit Hilfe eines
30 Helferstammes, der über die zur Konjugation notwendigen Gene verfügt, von einem selbst nicht zur Konjugation fähigen Donorstamm auf einen Akzeptorstamm übertragen. Wichtig ist hierbei nur, daß der Akzeptor über kein funktionierendes Restriktionssystem verfügt.

- 46 -

	Donor- Stamm	:	<i>E.coli</i> DH5 α
	Vektor	:	pTnMod-OGm
	Helfer- Stamm	:	<i>E.coli</i> HB101 mit pRK2013
5	Akzeptor- Stämme	:	<i>P.aeruginosa</i> TB

P.aeruginosa TB wurde über 5-7 Tage auf Blutagar bei 42°C inkubiert und dabei täglich überimpft. Donorstamm *E.coli* DH5 α (mit pTnMod-OGm) und Helferstamm *E.coli* HB101 (mit pRK2013) wurden am Vortag der Konjugation auf LB- Agar mit
10 entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen.

Die Bakterien wurden in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und auf eine Dichte von 1,0 OD eingestellt. Suspensionen von Donor, Helfer und Akzeptor wurden im Verhältnis 10:10:1 gemischt und auf einer LB-Agar Platte ausplattiert. Nach einer mehrstündi-
15 gen Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien resuspendiert und Aliquote auf M9 (Glycerol)- Agarplatten mit Gentamicinzusatz ausplattiert. Positive Transposon-
mutanten wurden nach ca. 2 Tagen Inkubation (37°C) auf eine neue M9(Glycerol)-
Agarplatte mit Gentamicin überführt. Nach einer 16- stündigen Inkubation bei 37°C
20 wurden die Platten für ca. 1 Monat bei 4°C gelagert, bevor die *P.aeruginosa*
Mutanten weiteren Experi-menten zugeführt oder bei -80°C eingefroren wurden.
Diese Lagerung war notwen-dig, um die mittransferierten *E.coli*, die zwar mit der
Kohlenstoffquelle Glycerol fast nicht wachsen, aber dennoch überleben können, von
den *P.aeruginosa* Mutanten abzutrennen. Die *E.coli* waren nicht in der Lage, eine
derart lange Hungerperiode zu überleben.

25

Präparation genomischer DNA von Gram- negativen Bakterien

Die Präparation genomischer DNA aus *P.aeruginosa* erfolgte nach einem speziell
für Gram- negative Bakterien entwickelten Methode (CHEN & KUO 1993). Die so
aufgearbeitete DNA wurde als Matrize in der PCR oder zur Herstellung von
30 Southern Blots eingesetzt.

Untersuchung der *P.aeruginosa*- Transposonmutanten

Phagozytostest

Die generierten *P.aeruginosa* TB - Transposonmutanten wurden auf ihre intragranulozytäre Überlebensfähigkeit getestet. Hierzu wurden Granulozyten frisch aus Blut präpariert und mit *P.aeruginosa* Transposonmutanten inkubiert. Die Granulozyten wurden durch Waschen und Filtrieren von den extrazellulären Bakterien separiert und anschließend lysiert, so daß die Fraktion der intrazellulären, lebensfähigen *P.aeruginosa* weiteren Analysen zugänglich wurde.

- 10 Pro Selektionsansatz wurden 10^7 frisch präparierte Granulozyten mit $2 \cdot 10^8$ cfu *P.aeruginosa*- Transposonmutanten in RPMI1640 (mit 10% humanem AB- Serum) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

- 15 Fig. 3 zeigt das Schema des Selektionsverfahrens zur Bestimmung der intrazellulären Überlebensfähigkeit in Granulozyten von *P.aeruginosa* TB- Transposonmutanten.

- 20 In einem parallel begonnenen Kontrollansatz wuchsen die Bakterien ohne äußere Selektion $2 \cdot 10^8$ Bakterien in RPMI 1640. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die extrazellulären Bakterien von den intrazellulären durch mehrfaches Waschen, Zentrifugieren und Filtrieren abgetrennt. Die Granulozyten wurden lysiert und aus den überlebenden Bakterien nach mehrstündiger Inkubation auf Vollmedium die genomische DNA präpariert. Aus einem Aliquot des Kontrollansatzes wurde entsprechend die DNA präpariert.

25

Untersuchung des Quorum Sensing

- Das Prinzip des Untersuchungsverfahrens besteht darin, die *P.aeruginosa* - Mutanten zusammen mit einem *E.coli* - Detektorstamm zu inkubieren, der über eine episomal kodierte, nur bei Anwesenheit von aliphatischen Homoserinlactonen exprimierte Luziferase verfügt.
- 30

Hierzu wurden die Transposonmutanten in Mikrotiterplatten angeimpft und bei 37°C inkubiert. Der das Sensorplasmid tragende Detektorstamm wurde in LB + Tetracy-

clin bis zu einer Dichte von OD 0,3 - 0,4 herangezogen und ein gleiches Volumen davon zu jedem *P.aeruginosa*- Transposonmutanten zugegeben. Nach 4 h Inkubation (37°C) wurde die Luziferaseaktivität mit einer Photonenkamera gemessen.

Die in dieser Untersuchung gefundenen auffälligen Mutanten wurden dann in einem
5 zweiten Experiment auf LB- Agar⁽¹⁾ zusammen mit dem Detektorstamm als Kreuzstrich erneut überprüft.

Bestimmung der Invasivität von *P.aeruginosa*- Mutanten in Epithelzellen

Zellkultur eukaryontischer Epithelzellen (Chang- Zellen)

10 Aus der Ausgangskultur (50 ml, 37°C, 5% CO₂) mit präkonfluent gewachsenen Zellen wurde das Medium (RPMI1640 mit 5% FCS) abgenommen und die Zellen mit Trypsinlösung für 5-10 min bei 37°C inkubiert. Sobald sich die Zellen von der Oberfläche gelöst hatten wurde RPMI1640 mit 5% FCS zugesetzt und die Zellzahl mit einem Mikroskop in einer Neubauer- Zählkammer bestimmt. Aus dieser Zellsuspension
15 wurden Aliquote für die folgenden Experimente entnommen.

Mikroskopische Untersuchung der Invasivität

Die schnellste Möglichkeit zur Bestimmung der Invasivität unterschiedlicher *P.aeruginosa* Mutanten besteht in der mikroskopischen Untersuchung von adhären-
20 renten Epithelzellen, die mit den jeweiligen *P.aeruginosa* inkubiert worden waren. Zur besseren Sichtbarkeit wurden die Zellen mit nach 1 stündiger Inkubation mit Bakterien (im Verhältnis Zellen: Bakterien = 1: 100) mit Formaldehyd fixiert und mit Kristallviolett angefärbt. Die Auszählung erfolgte unter dem Mikroskop bei 1000x Vergrößerung.

25

Quantifizierung der Invasivität von *P.aeruginosa*

Die ersten Arbeitsschritte zur quantitativen Bestimmung der Invasivität von *P.aeruginosa* - Stämmen ähneln denen im obigen Kapitel. Die Behandlung der Bakterien und der Epithelzellen entspricht den o.g. Protokoll. Auch in diesem Experiment wurden die Epithelzellen für eine experimentell zu bestimmende Zeit mit ei-
30 nem 100-fachen Überschuß an Bakterien inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubation (37°C, 5% CO₂) wurden die Epithelzellen zur Abtrennung der Bakterien im Überstand dreimal mit RPMI1640 gewaschen und für 120

- 49 -

min mit RPMI1640 +100 µg/ml Polymyxin B inkubiert (37°C, 5% CO₂), um die adhären-
renten extrazellulären Bakterien abzutöten. Danach wurden die Zellen erneut zwei-
mal mit RPMI1640 gewaschen und zur Freisetzung der intrazellulären Bakterien 5-
10 min mit Saponinlösung (50 mg/ml) inkubiert. Aliquote dieses Lysats sowie deren
5 Verdünnungen wurden auf LB- Agar ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert
und die Lebendkeimzahl bestimmt.

Zur Bestimmung der Adhärenz der Bakterien an die Epithelzellen wurde ein ver-
gleichbares Experiment durchgeführt, jedoch entfiel die Inkubation mit Polymyxin B.
Die Epithelzellen wurden nur viermal mit RPMI1640 gewaschen, bevor sie lysiert
L0 wurden.

Flagellinnachweis bei *P.aeruginosa*

Bei einigen Transposonmutanten wurde bei der Untersuchung der intrazellulären
Überlebensfähigkeit ein Zusammenhang mit der Regulation des Flagellenaufbaus
L5 gefunden. Zur näheren Charakterisierung wurden die folgenden Untersuchungen
durchgeführt.

Immunologische Untersuchung der Flagellenmutanten

20 Die zu untersuchenden Bakterien wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium herange-
zogen und je 3 ml Bakteriensuspension für die weiteren Untersuchungen abge-
nommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden $4 \cdot 10^{10}$ Bakterien abzentrifugiert
und in 1 ml PBS resuspendiert. Aliquote von 10^8 und 10^7 Bakterien (aus einer 1:10
Verdünnung) wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA85, 0,45 µm) auf-
25 getragen und bei 37°C getrocknet.

Die Detektion des Flagellins erfolgte nach dem Protokoll der Firma Tropix, das ge-
nerell für immunologische Detektionen eingesetzt werden kann. Als primärer Anti-
körper wurde ein Kaninchen-AK gegen Flagellin Typ b (Montie T, Univ. Tennessee,
Knoxville) eingesetzt.

30

Färbung von Flagellen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung

P.aeruginosa aus einer über Nacht bei 37°C inkubierten Kultur wurden durch
Zugabe von Formaldehyd (Endkonzentration 1%) abgetötet und auf einer

Glimmermatrix fixiert. Die Färbung geschah mit 5 mM Uranylacetat (pH 7,0), das für 5 min auf die Bakterien einwirkte. Nach zweimaligem Waschen mit dest. Wasser wurde das Präparat getrocknet und auf einem Kupfer- Träger fixiert. (Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte an der GBF durch Dr. M. Rohde)

5

Selektion von STM- Mutanten

Die *P.aeruginosa*- Transposonmutanten wurden separat in Mikrotiterplatten aus eingefrorenen Glycerol- Kulturen angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je
10 48 Transposonmutanten mit verschiedenen Signalsequenzen wurden vereinigt und in einem Phagozytostest auf ihre Überlebensfähigkeit in Granulozyten untersucht. Hierbei wurde jede Gruppe von 48 Mutanten je zwei unabhängigen Experimenten unterzogen.

15 Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Bakterien (selektierte und unselektierte Proben) in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und ein zweites Mal den Selektionsbedingungen ausgesetzt. (Die Kontrollen wurden entsprechend nur in RPMI1640 suspendiert.) Die auf LB-Agar ausgestrichenen Bakterien wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Erst nach dieser zweiten Selektion wurde die genomische
20 DNA der überlebenden Bakterien isoliert.

Aus diesen DNA- Lösungen wurden dann mit PCR die Signalsequenzen der Transposons amplifiziert. Die so erhaltenen Signalsequenzen wurden mit *Hind*III restriktionsverdaut und die spezifische 40 Bp- Sequenzen über eine Gelfiltration (Sephadex
25 G-100) aufgereinigt. Die aufgereinigten 40 Bp- Sequenzen wurden mit Hilfe einer Terminalen Transferase am 3'- Ende mit DIG- ddUTP markiert.

Die Signalsequenzen der Donor-Plasmide wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert und als Dot- Blots auf Membranen fixiert. Auf diese vorbereiteten Blots wurden die
30 3'-endmarkierten Signalsequenzen aus dem Phagozytostest bei 65°C (16h) hybridisiert. Die Häufigkeit der einzelnen Signalsequenzen wurde durch eine Lichtreaktion bestimmt. Die erhaltenen Röntgenfilme wurden gescannt und die Schwärzung

(od/mm^2) der einzelnen Dots ermittelt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte in MS- Excel.

Plasmid- rescue

- 5 Das Plasmid- rescue (AUSUBEL ET AL. 1987-95) ist ein Verfahren, um die flankierende DNA eines inserierten Plasposons in episomal stabile Plasmide zu überführen. Hierzu wurde die genomische DNA eines Transposonmutanten mit einer Restriktionsendonuklease verdaut und die entstehenden Fragmente in einer Selbstligation zu Ringstrukturen überführt. Nur die genomische Sequenz, in die das
- 10 Plasposon integriert war, besaß einen Replikationsursprung und eine Antibiotikakassette und konnte nach Transformation in *E.coli* auf einem entsprechenden Selektionsmedium stabil exprimiert werden. Diese Plasmide wurden dann zur Sequenzierung der flankierenden genomischen DNA- Abschnitte des inserierten Transposons verwendet.
- 15 Die genomische *P.aeruginosa*- DNA wurde mit *Pst*I oder *Bcl*I / *Bam*HI verdaut und die DNA über eine Phenol /Chloroform-Extraktion mit einer anschließenden Ethanolfällung aufgereinigt. Zur Reaktion wurde die verdaute genomische DNA mit T4- Ligase inkubiert. Die Ligationsansätze wurden in einem Vakuumkonzentrator eingeeengt und in *E. coli* transformiert. Aus den hierbei erhaltenen Plasmiden wurde
- 20 durch Sequenzierung die flankierende DNA- Sequenz der Transposoninsertion bestimmt.

Literatur

Current Protocols in Molecular Biology (AUSUBEL ET AL, 1987-95)

- 5 BOLDUC, G.R., BOUCHET, V., JIANG, R.Z., GEISSELSODER, J., TRUONG- BOLDUC, Q.C.,
RICE, P.A., PELTON, S.I., GOLDSTEIN, R. (2000) Variability of outer membrane
protein P1 and its evaluation as a vaccine candidate against experimental
otitis media due to nontypeable *Haemophilus influenzae*: an unambiguous,
multifaceted approach. *Infect Immun* **68**: 4505-4517
- 10 BOTZENHARDT K. & DÖRING G (1993): Ecology and epidemiology of *Pseudomonas*
aeruginosa; 1-18. In: CAMPA M, BENDINELLI M, FRIEDMAN H (ed.):
Pseudomonas aeruginosa as an opportunistic pathogen; Plenum Press New
York
- BRAVENY I, KRUMP- SCHMIDT W (1985): *Pseudomonas aeruginosa*; W. Zuckschwerdt
15 Verlag, München
- CHEN, W., KUO, T.T. (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram
negative bacterial genomic DNA *Nuc Ac Res* **21**:2260.
- Chiang, S.L., Mekalanos, J.J., Holden, D.W. (1999) In vivo genetic analysis of bac-
terial virulence. *Annu Rev Microbiol* **53**, 129- 154.
- 20 COSTERTON J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA,
M., MARRIE, T.J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease; *Ann. Rev.*
Microbiol. **41**: 435-464.
- DEKIEVIT, T.R., IGLEWSKI, B.H. (2000) Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic
Relationships. *Infect Immun* **68**: 4839-4849.
- 25 DENNIS, J.J., ZYLSTRA, G.J. (1998) Plasmids: modular self-cloning minitransposon
derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes.
Appl Environ Microbiol **64**:2710-15
- DIRUSSO, C.C., BLACK, P.N. (1999) Long-chain fatty acid transport in bacteria and
yeast. Paradigms for defining the mechanism underlying this protein-
30 mediated process. *Mol Cell Biochem* **192**:41-52
- FAREWELL, A., DIEZ, A.A., DIRUSSO, C.C., NYSTROM, T. 1996 Role of the *Escherichia*
coli FadR regulator in stasis survival and growth phase- dependent
expression of *uspA*, *fad* and *fab* genes. *J Bacteriol* **178**:6443-6450.

- FIGURSKI, D., HELINSKI, D. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979 **76**:1648-1652.
- HASSETT, D.J., MA, J.F., ELKINS, J.G., MC DERMOTT, T.R., OCHSNER, U.A., WEST, S.E., HUANG, C.T., FREDERICKS, J., BURNETT, S., STEWART, P.S., MCFETERS, G., PASSADOR, L., IGLEWSKI, B.H.(1999) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* **34**:1082-1093.
- 10 Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., Holden, D.W. (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**: 400-403.
- Hensel, M. (1998) Whole genome scan for habitat-specific genes by signature-tagged mutagenesis. *Electrophoresis* **19**, 608- 612.
- 15 HOBBS, M., MATTICK, J.S. (1993): Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein- secretion apparatus: a general system for the formation of surface- associated protein complexes. *Mol Microbiol* **10**: 233-243
- HØIBY, N., DÖRING, G., SCHIØTZ, P.O. (1986) The role of immune complexes in the pathogenesis of bacterial infections *Ann Rev Microbiol* **40**: 29-53.
- 20 HORAN TC (1986): Nosocomial infection surveillance 1984, *Morbid. Mortal. Wkl. Rep.*; **35**: 17-29.
- LUMPPIO, H.L., SHENVI, N.V., SUMMERS, A.O., VOORDOUW, G., KURTZ, D.M. (2001) Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgans*: novel oxidative stress protection system. *J Bacteriol* **183**: 101-108.
- 25 MACNAB, R.M. (1992): Genetics and Biogenesis of bacterial flagella. *Annu Rev Genet* **26**:131-158.
- MAHAN, J.M., SLAUCH, J.M., MEKALANOS, J.J. (1993) Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues *Science* **259**: 686- 688
- 30 MAHAN, J.M., TOBIAS, J.W., SLAUCH, J.M., HANNA, P.C., COLLIER, R.J., MEKALANOS, J.J. (1995) Antibiotic- based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host *Genetics* **92**: 669-673.

- MARTIN, P.R., HOBBS, M., FREE, P.D., JESKE, Y., MATTICK, J.S. (1993): Characterization of *pilQ*, a new gene required for the biogenesis of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **9**: 857-868
- Mecsas, J. (2002) Use of signature-tagged mutagenesis in pathogenesis studies. *Curr Opin Microbiol* **5**, 33- 37.
- MINAMINO, T., MACNAB, R.M. (1999) Components of the Salmonella flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol* **181**:1388-1394.
- OHBA A, MIZUSHIMA T, KATAYAMA T, SEKIMIZU K(1997): Amounts of proteins altered by mutations in the *dnaA* gene of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **404**:125-128.
- PIANZZOLA, M.J., SOUBES, M., TOUATI, D. (1996) Overproduction of the *rbo* gene product from *Desulfovibrio* species suppresses all deleterious effects of lack of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 6736-6742
- PIER G.D. (1985) Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host - bacterium interaction *J Infect Dis* **151**: 575-580.
- POLLAK, M. (1985) *Pseudomonas aeruginosa*; 1236-1250. In: MANDELL, G.L., DOUGLAS, R.G. JR., BENNET, J.E. (ed.) Principles and practice of infectious diseases, 2. Auflage; John Wiley & Sons, New York
- RAINEY, P.B., HEITHOFF, D.M., MAHAN, M.J. (1997) Single-step conjugative cloning of bacterial gene fusions involved in microbe-host interactions *Mol Gen Genet* **256**:84- 87.
- SLAUCH, J.M., MAHAN, M.J., MEKALANOS, J.J. (1994) In vivo expression technology for selection of bacterial genes specifically induced in host tissues *Methods Enzymol* **235**: 481- 492.
- STOREY, D.G., UJACK, E.E., RABIN, H.R., MITCHELL, I. (1998): *Pseudomonas aeruginosa* *lasR* transcription correlates with the transcription of *lasA*, *lasB*, and *toxA* in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infect Immun* **66**:2521-8.
- TAKASE, H., NITANAI, H., HOSHINO, K., OTANI, T. (2000): Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa tonB* gene for high-affinity iron acquisition and infection. *Infect Immun* **68**: 4498-4504.

WEI, Y., LEE, J.M., RICHMOND, C., BLATTNER, F.R., RAFALSKI, J.A., LAROSSA, R.A.
(2001) High- density microarray- mediated gene expression profiling of
Escherichia coli. *J Bacteriol* **183**: 545-556.

5 YOUNG, G.M., SCHMIEL, D.H., MILLER, V.L. (1999) A new pathway for the secretion of
virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a
protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:6456-6461.

Patentansprüche:

- 5 1. Isolierte oder rekombinante Nukleinsäure, gekennzeichnet durch eine der Sequenzen gemäß Seq. ID 1, Seq. ID 2 oder Seq. ID 3 oder eine hierzu degenerierte oder modifizierte homologe Sequenz mit entsprechender Funktion, wobei die Modifikationen Deletionen, Insertionen und/oder Substitutionen von Aminosäuren umfassen, insbesondere Punktmutationen.
- 10 2. Protein, welches kodiert wird durch eine Sequenz gemäß Anspruch 1 oder ein hierzu homologes, im wesentlichen funktionsgleiches Protein oder Peptid, insbesondere ein solches mit durch Deletion, Insertion oder Austausch einzelner und/oder mehrerer Aminosäuren, sequenzverlängerndes Anfügen von einzelnen und/oder mehreren Aminosäuren und/oder chemischer Derivatisierung insbesondere der terminalen Aminosäuren verbundener Sequenz-Modifikation.
- 15 3. Verwendung der Nukleinsäuren oder Nukleotidsequenzen PA0740, PA1104, PA1288, PA1322, PA1441, PA1452, PA1572, PA1992, PA2591, PA3344, PA4621, PA5040, PA5349 und/oder PA5415 des Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*, bezeichnet gemäß Nomenklatur des *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project, und/oder der Nukleinsäuren oder Nukleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 1, oder von Fragmenten oder modifizierten Sequenzen der vorstehenden Nukleinsäuren oder Nukleinsäuresequenzen mit entsprechender Funktion, oder der jeweils zugehörigen *Pseudomonas aeruginosa*-eigenen Proteine, die sämtlich für die Überlebensfähigkeit des Mikroorganismus in Mensch oder Tier wesentlich sind, als Targets für die Entwicklung von Diagnostika zur Identifizierung der Virulenz eines *Pseudomonas aeruginosa* Stammes.
- 20 25 30 4. Verwendung der Nukleinsäuren oder Nukleotidsequenzen PA0740, PA1104, PA1288, PA1322, PA1441, PA1452, PA1572, PA1992, PA2591, PA3344, PA4621, PA5040, PA5349 und/oder PA5415 des Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*, bezeichnet gemäß Nomenklatur des *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project, und/oder der Nukleinsäuren oder Nukleinsäure-

sequenzen gemäß Anspruch 1, oder von Fragmenten oder modifizierten Sequenzen der vorstehenden Nukleinsäuren oder Nukleinsäuresequenzen mit entsprechender Funktion, oder der jeweils zugehörigen *Pseudomonas aeruginosa*-eigenen Proteine, die sämtlich für die Überlebensfähigkeit des Mikroorganismus in Mensch oder Tier wesentlich sind, als Targets für die Entwicklung von Therapeutika gegen *Pseudomonas aeruginosa* Stämme.

5. Verwendung der Nukleinsäuren oder Nukleotidsequenzen PA0740, PA1104, PA1288, PA1322, PA1441, PA1452, PA1572, PA1992, PA2591, PA3344, PA4621, PA5040, PA5349 und/oder PA5415 des Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*, bezeichnet gemäß Nomenklatur des *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project, und/oder der Nukleinsäuren oder Nukleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 1, oder von Fragmenten oder modifizierten Sequenzen der vorstehenden Nukleinsäuren oder Nukleinsäuresequenzen mit entsprechender Funktion, oder der jeweils zugehörigen *Pseudomonas aeruginosa*-eigenen Proteine, die sämtlich für die Überlebensfähigkeit des Mikroorganismus in Mensch oder Tier wesentlich sind, als Targets für die Entwicklung von Impfstoffen gegen *Pseudomonas aeruginosa* Stämme.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass anstelle von oder in Verbindung mit PA 1441 die Sequenzen PA1104 und/oder PA1452 verwendet werden.

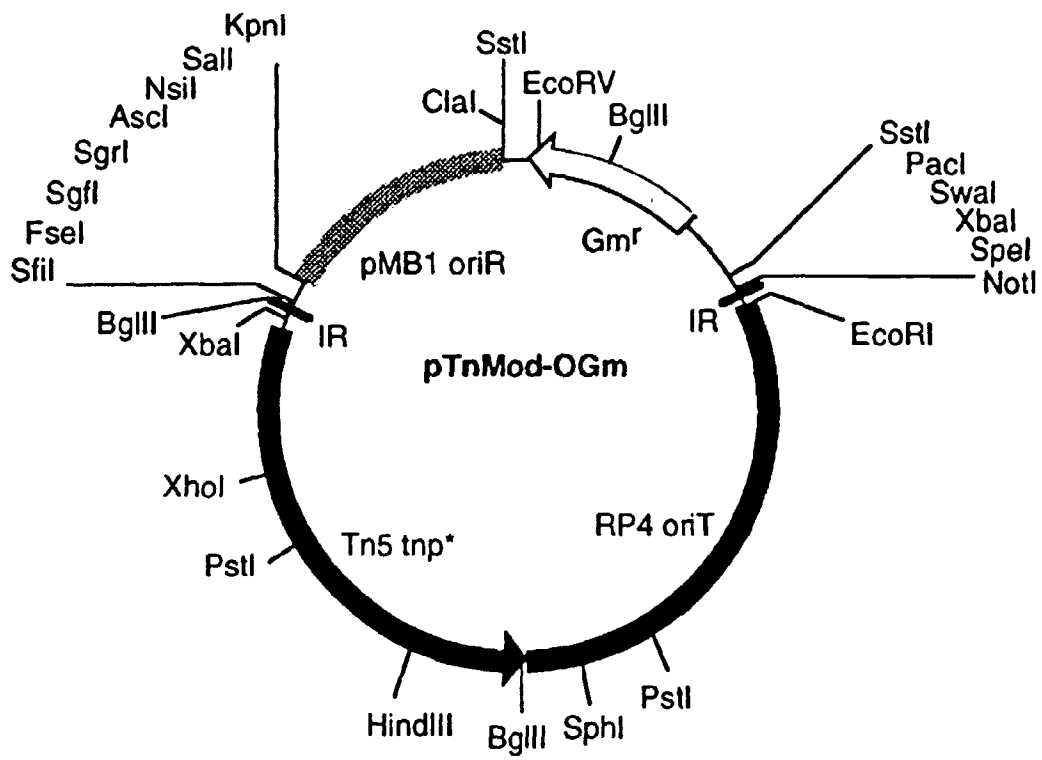
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass anstelle der Proteine zu diesen homologe Proteine oder Proteinbruchstücke der Proteine und homologen Varianten verwendet werden, insbesondere solche mit durch Deletion, Insertion oder Austausch einzelner und/oder mehrerer Aminosäuren, sequenzverlängerndes Anfügen von einzelnen und/oder mehreren Aminosäuren und/oder chemischer Derivatisierung insbesondere der terminalen Aminosäuren verbundener Sequenz-Modifikation.

8. Antikörper, die gegen durch eine der Nukleinsäuresequenzen PA0740, PA1104, PA1288, PA1322, PA1441, PA1452, PA1572, PA1992, PA2591, PA3344, PA4621, PA5040, PA5349 und PA5415 des Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*, bezeichnet gemäß Nomenklatur des *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project, oder gegen Fragmente oder modifizierte Sequenzen der vorstehenden Nukleinsäuren oder Nukleinsäuresequenzen mit entsprechender Funktion, oder gegen ein durch eine der Nukleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 1 oder der vorstehenden Sequenzen kodiertes Protein oder wenigstens ein funktionelles Fragment eines solchen Proteins gerichtet sind, insbesondere für die Verwendung bei der Bestimmung der Virulenz von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen.
9. Vakzine, enthaltend wenigstens ein durch eine der Nukleinsäuresequenzen PA0740, PA1104, PA1288, PA1322, PA1441, PA1452, PA1572, PA1992, PA2591, PA3344, PA4621, PA5040, PA5349 und PA5415 des Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*, bezeichnet gemäß Nomenklatur des *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project, oder der Nukleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 1 kodiertes Protein oder wenigstens ein funktionelles Fragment eines der vorgenannten Proteine, oder wenigstens ein auf dem Protein oder funktionellen Teil des Proteins basierendes Fusionsprotein.
10. Vakzine, enthaltend wenigstens eine der Nukleinsäuren gemäß Sequenzen PA0740, PA1104, PA1288, PA1322, PA1441, PA1452, PA1572, PA1992, PA2591, PA3344, PA4621, PA5040, PA5349 und PA5415 des Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*, bezeichnet gemäß Nomenklatur des *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project, oder von Fragmenten oder modifizierten Sequenzen der vorstehenden Nukleinsäuren oder Nukleinsäuresequenzen mit entsprechender Funktion, oder der Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1, in modifizierter, in Säugetierzellen ablesbarer Modifikation und in Zuordnung zu einem in Säugetierzellen ablesbaren Promotor.
11. Vakzine gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das wenigstens eine Gen mit dem zugehörigen Promotor in ein Plasmid ligiert vorliegt.

12. Vakzine gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11, zusätzlich übliche Zusatz- und Hilfsstoffe sowie vorzugsweise wenigstens ein Adjuvans enthaltend.

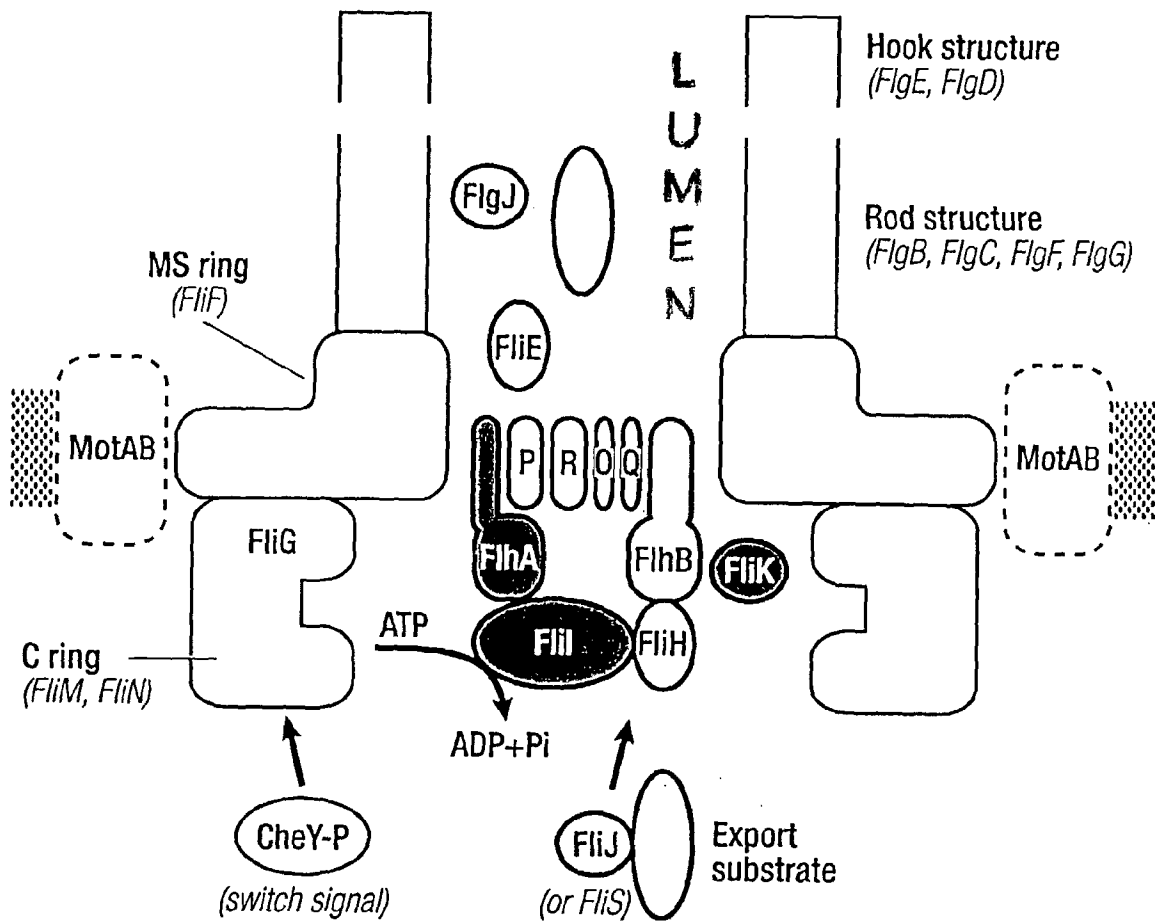
5 ML

1/3



Figur 1

2/3



Figur 2

3/3

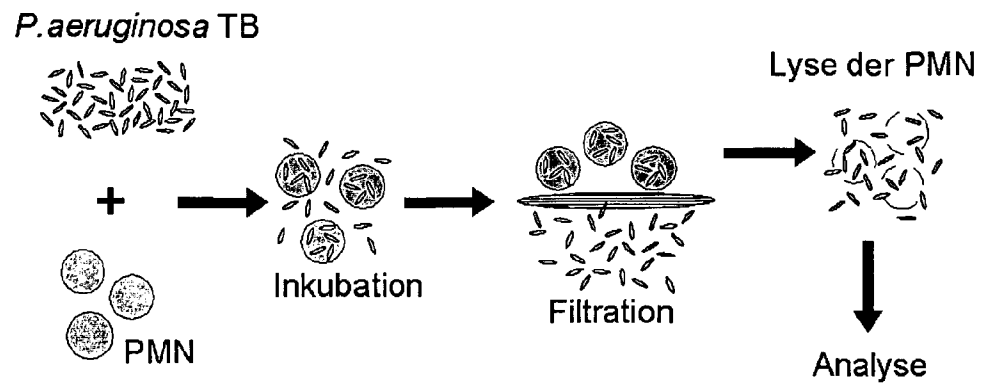


Fig. 3

SEQUENCE LISTING

<110> Medizinische Hochschule Hannover

<120> Phänotyp bestimmende Virulenzgene von *Pseudomonas aeruginosa* zur Ko-kolonisation und Persistenz in Mensch, Tier und Pflanze, Verwendungen der Gene und zugehörigen Proteine

<130> 3096-003 PCT-1

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1977

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 1

atgagcgcgtc tgcttgcact cctggcgctc gccccgctgc tcgccggcgc cgccgaaacc
60

accgcgccca aaccgcccag tgccttcacc gtcgaggccc agcggcgggt cgaagcggaa
120

ttgcccttcg ccgaccgcgc cgacttcgag cgcgccgacc gcggcctgat ccggcgcccg
180

gagcggttac tcattccgcaa ccccgacggc agcgtcgctt ggcagctcgg tggctacgac
240

ttcctcctcg acggcaagcc tcgcgacagc atcaatccca gcctgcaacg ccaggccctg
300

ctcaattctca agtacggctt gttcgagggt gccgagggt tctaccaggt gcgcggcttc
360

gacctggcca acatcacctt catccgcggc gacagcggct ggatcgtggt cgacaccctg
420

accaccccg ccaccgccag ggcggcctac gaactggtca gccgcgagct gggcgagagg
480

ccgatccgta cggatgatcta cagccacgcc cagccgatc actttggagg cgtgcgcggt
540

ctggtagagc cacagcaggt cgccagcggc gcggtgcaga tcacgctcc ggccggcttc
600

atggaggcgg cgatcaagga gaacgtcctg gccggcaacg ccatgatgcg ccgcgccacc
660

taccagtacg gcacgcaact gcccaagggg ccgcaggggc aggtcgacat ggccatcggc
720

aagggattgg cgcgcggacc gctgagcctg ctggcgccga cccgcctgat cgaaggcgag
780

ggcgaggacc tgggtgctgga cggcgtgccg ttcaccttcc agaacacgcc gggcaccgag
840

tcgccggcgg agatgaacat ctggctgccg cggcagaagg ccctgctgat ggccgagaac
900

gtggtcggta ccctgcacaa cctgtacacc ctgcgcggcg ccgaggtacg tgatgcgctg
960

ggctggagca agtacatcaa ccaggcgctg catcgtttcg gcaggcaggc cgaggtgatg
1020

ttcgcggtgc acaactggcc gcgctggggc aacgcggaga tcgtcgaggt gctggagaag
1080

cagcgcgacc tgtacggcta cctgcacgac cagaccctgc acctggccaa ccagggcgctg
1140

accatcggcc aggtgcacaa ccgcctgcgc ctgccgcca gcctcgacca ggaatggtac
1200

gaccgcggct accacggctc ggtcagccat aacgcacggg ccgtgctgaa ccgctacctg
1260

ggctactacg acggcaaccc ggcgaccctc gaccgcgtca gcccgaggga ctcggcgggc
1320

cgctacgtgg aatacatggg cggcgccgag cgctgtttgg agcaagcgcg ggcgtcgtac
1380

gccaggggcg aataccgttg ggtggtcgag gtggtcaaca ggctggtctt cgccgagccg
1440

gataatcggg ccgcgcgcga gctgcaggcc gacgccttgg agcaactcgg ctaccaggcg
1500

gagaacgccg gctggcgcaa cagctacctc agcgccgcct acgaactcgg ccacggcgta
1560

ccgcgcgacc agccgacgat gaaggccggc agcgccgatg ccctggcggc gatggacacc
1620

ggcctgctgt tcgactatct cggcgtgcgc ctggacgccg gcgctgcgga gggcaaggcg
1680

ctgagcatca acctg'gcct gccggacatc ggtgagaact acctgctgga actgaagaac
1740

tcgcacctga acaacctgcg cggcgtgcag agcgaggacg ccgggcagac cgtgagcatc
1800

gaccgcgccg atctcaaccg gctgctgctc aaagaggat cggcggtagc cctggtcttc
1860

gagggcaagc tgaagagttc cggcaatccg ctgttgctgg ggcaactgtt cggcatgctc
1920

ggcgacttcg acttctggtt cgatatcgtc acgccggcgg cgaagtccga aggctga
1977

<210> 2

<211> 1356

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 2

atgcgccttg agcgaaccag ttctgccagg cgcttgagg gctacaccga ggctgtctcg
60

ctgccggcgc agccggtggt cgagggccgc ctgctgcgca tggtcggcct gaccctcgaa
120

gccgaaggct tgcaggccgc ggtcggcagc cgctgcaacg tgatcaacga aagcggctac
180

caccgggtgc aggtggaggc cgaagtgatg ggcttttccg gtagcaaggt gtacctgatg
240

ccggtcggca gcctcgccgg catcgcgccc ggcgcgagg tcgtgccgct gccggacacc
300

gggcgcctgc cgatgggcat gtcgatgctc ggccgcgtgc tcgacggcgc cggccgcgcc
360

ctcgacggca agggcgggat gcgcgccgaa gactgggtgc cgatggacgg cccgacgata
420

aaccgctca agcgcaccc gatcagcgaa cctctcgacg tcggcatccg ctcgatcaat
480

ggcctgctca cggtcggccg cggccagcgc ctcggcctgt tcgccgttac cggggtgggc
540

aagtcggtgc tgctggggat gatgaccgc ttcaccagg cgcacatcat cgtcgtcggt
600

ctgatcggcg agcggggccg cgaggtgaag gagttcatcg acgagatcct cggcgaggaa
660

ggcctcaagc gctccgtggt ggtcgcctcg ccggccgacg acgcgccgct gatgcgctg
720

cgtgccgcg aatactgcac gcggatcgcc gagtatttcc gcgacaaggg caagaacgta
780

ttgctgctga tggactcgct gacccgctac gccaggccc agcgcgagat cggcctggcc
840

atcggcgagc caccggcgac caaggggtat ccgccatcgg tgttcgcaa gctgccgaag
900

ctggtggaac gcgccggcaa tgccgaagcc ggtggcggct cgatcaccgc gttctacacc
960

gtgctctccg agggcgacga ccagcaggac ccgatcgccg acgccgctcg cggcgtgctc
1020

gacgggcact tcgtattgtc ccggcggctg gccgaggaag gccactatcc ggccatcgat
1080

atcgaagctt cgatcagccg ggtgatgccg caggtggtcg aggccgagca cctgcgcgac
1140

gcccagcgt tcaagcagct ctggtcgcgc taccagcaga gtcgcgacct gatcagcgtc
1200

ggtgcctacg tggccggcgg cgatcccag accgacctgg ccatcgcgcg cttcccggtc
1260

atgcgccagt tcctgcgcca gggccttgac gaaagcgaaa gcctggcgga aagccgtgcg
1320

cggtggcga gcctgctcgc cggcgggcag gcctga
1356

<210> 3

<211> 1275

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 3

atgaaaacaa tatggtttaa aacctctctc gcactgacca ttagcgctgt ctccacctac
60

accctcgcca acggcatcgc catcaacgaa cagagcgcca gcggcgccgg caccgcctac
120

gccggccgcg cctcgtccgc gctc gatgcc agcaccatct acggcaaccc ggccggcctg
180

tccaagctga aacgcaccga agtcagcggc ggtctggcca tcgtcaaggc caaggacgac
240

atcagccagg cccacagcac cgcccagggc agcaacaagg gcgactcggg accgctggcc
300

gccgtaccgt tcggctactt ctccacgccg atcaacgaag atttcacttt cggcctgggc
360

atctacgtgc cctacggcat catcaacgat tacgaaaacg gcttcatggg cagctccac
420

ggctcctata gcaagggtgca ggtgatcacc gtgcagccga ccatcgccctg gaagatcaac
480

gacaaggttt ccgtcggctt cgggccgacc ttcaaccgca tcgacggcca gttgaagaac
540

accctggcca ccaatggcct gctcggcagc aacggcgata ccaagatcaa catcaagggc
600

gacgacaccg ccatcggcta caacgtcggc gtgatggtcg acctgaccga cgacaccacc
660

tggggcctga cctaccactc caaggtcaag taccacctgg gcggcaacac cgaagtgaag
720

aacgtccgg gtgccctggg cctgaacggc aagtacgatg ccaagctgga catcacctg
780

ccggaatcgg tggatacctc catcacccac aagttcgacg acaagtggac gggctacctg
840

ggcgccgtct ggaccgcgtg gagccgcctg gagaagatcg aggtgogcaa cagcggcgta
900

ccggcgctcg gccaggccct gggcttcaac accatcggcg aagacctgaa ctggcgcgac
960

acctggctct tctcggtagg tacctcctac caggccaccc cggagtgggt gctgcgaccc
1020

ggctttgcct acgagccgtc gccgacctcc aacgaggacc gcaacgtgcg catcccgtg
1080

ggcgaccgca aggtcttcac cgtcgggtgcc ggctggtcgc cgaaccagga cctgaccgtc
1140

gacgtggcct acgcctacct gtgggaaacc accgccggcg tcaaccagga aggcagcgcc

1200

ctgcagccgg cctacagcgc caagtagcac aacagcgcgc atggcctgac cgcccaggtc
1260

acctatcgct tctga
1275

<210> 4
<211> 2199
<212> DNA
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 4
atggatcgtc gcaacgagcc gtcccccttg ccaccaaac gcccgctggc gccgctgatg
60

ctgttgatgg ccgctgctc ctgcgcggcc ctggccgagg acgcggcgcg caaggacgat
120

cccctggaac tgggagccga cacggtcacc ggcgagcagg cctcgtccag ggtcgaacgc
180

tggcctcgg ccaagtagc cgtgccgctg ctggataccc cgcagaccgt cacggtggtg
240

ccgcaaaagg tgatccagga gcagaacgcc ctgagcctgc gccaggctgt gtccaacgtc
300

tccggcatca ccttcaacgc cggcgagggc ggcggcggtt ccggcgacag catcaacatc
360

cgcggcttca gcgccaacgc caacatgcag gtggacgggc tgcgcgacag cgcccagacc
420

agccgcagcg acctgttcaa cctggaggcg gtggaagtga tcaagggacc gaactcgggtg
480

ttcggcgggc ccggcaccag cggcggcagc atcaacatgg tcagcaagca gcccaaggcc
540

gaagccttca ccacactggg cgccgggctg ggcacggacc gctaccggcg cctgaccctg
600

gacaccaacc agccgctgga agggcttggc gaatcgaccg ccttcgcct caacctcatg
660

gccaccaca acgacgtcgc cgggcgcgaa cagatcgaca agcagcgtg gggcatcgcg
720

ccatccctga ccttcggcct ggacaccccg acccgctga cctgagcta cttccaccag

780

cgcgacgaca accttcccga ctatggcgtg ccggcgctga acgggcgcaa gctggacggc
840

gtcagccgcc acgattatct cggctggcgc aacctggacg aggaacggat cgacaacgac
900

gtcgccaccc tcaagctcga acacgatttc agcgacgact tccagttgca gaacctcatc
960

cgctattccc acctgcatcg ggacacggcg atctccgcct cccacgtcaa ccagaagggc
1020

ctgccgccgg gtcgctacct gccggcggga ccgcaagcct acgggcgcga ttcgaagacg
1080

cggatgtgga tcaaccagac caacctcacc ggccgcttcg ataccttcgg cctggcgcat
1140

acgctgacgc gcggcttcga gctgtccgcg gagacctacg accgcaccac ctactcctac
1200

aacctgggca agttctaccc ggccaacggc ttcgacctgc acaaccgcgc gggctactgg
1260

aacggcccca ccgacaagcg cgacagcgcg cgcaaccgga ccgaactgga ggtcaaggcg
1320

ctgtacgcct tcgacaccat cgccctggac gagcgctggg acctcagcct gggcctgcgc
1380

tacgactgga tcgacggcac ctcgcgggagc acgccctcag gcaagccgac ggtgcgcgcc
1440

gacagttccg acggcaagct gagcacacgg gcggggctgg tattcaagcc gctggagaac
1500

gggcgggtgt acttctccta cggcacctcc ttcaaccctt cggcggaaca cctggtcacc
1560

accggctcgg gcgtgaccga ggcgaccgga ggcctggcgc cggagaagaa cagcacctac
1620

gagctgggca ccaagtggga gttcctcgga cggcgccctg agctggacgc ggcgctgttc
1680

caggtgaaga aggaggacgc tcgcgaacgc ctggccgacg gcagctacgt gcttgccggc
1740

gaacagcgcg tgcgtggcct ggagctgagc gccagcggca agctgaacga gcactgggac
1800

ctcttcgcca cctacaccta cctcgacagc gaaaccctga aatccagcaa cccgcagcgt
1860

gagggacagg ccctgggcaa taccgccg cgctcggtga gcctctggag cacctacgaa
1920

ctgcccagagg gcgtgaccct gggctatggc gcacgctacg tcagccagcg caacgtcacc
1980

tcgggtggaca acggcaagct ggatgcctac tgggtgcaca acatgatgct cggctaccag
2040

gcgacgcgcg acctgaaact gcaactcaac ctcgacaacc tgttcgacaa ggcctacgtc
2100

gagcggtgtc gccaggtgta cggcaaccag tcgcgctcct cggccatcga gtatggcgac
2160

ggtcgcacgg cgattctttc ggcgatctac gcgttctga
2199

<210> 5

<211> 1284

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 5

atggccgtcg ccctggtgt gttgttgccg ccgacgcctg atgtaaagcc caaggccgct
60

gcgccgaaga gccagcagaa aacgcctgag ccagtaacg acaagacttc cagcttctcc
120

gacatgtatg ccaaggagac cgccaagaag cccgccgagc gcgccgacgg tcccgcgaag
180

ggttcgcggg acaagccacg ggacgccggc aaggacgccg ccgaagcgca gccgacggat
240

gccgtcaggg agccggccgt tgccgaagac ggcaagcctt tgccggccga cggccaggcc
300

aaggccgacg gcgaagataa agtcgaaacg ccggtcgatc cgctgcaatt gtcgggctc
360

ggcggtgccg taccgttgct cgacgagaat acccaggcga ctttgctgcc accggccgtg
420

ccgacggcca gcagtgtctc ggccagcctt accgaagcca gcagcgaccc gaccctggtc
480

aagctcaacg gcgtgccggc ggtgaacatg gccctggagc agggcgccca ggacgccgcg
540

cagacggcga aaggcgggcc ggcgaagagc gccgatcccc gccaggcgaa cctcggcgat
600

gcccttgccg gcctgacctc ggattccttg accaaggccg tcgacggcaa ggcgctcgag
660

gccagttgc agcagaccgc cgagccggcc gtcgccagcg ccgcctccga gagcctgctg
720

gagagcaagg cggaaccccc cggatgaacct ttgcggcca agctcaacgg gctgaccag
780

gccatggcgc aacaggccct gaccaaccgt ccggtgaacg gcacgggtgcc cggccagccg
840

gtggcgatgc agcagaacgg ctggagcgag gcggtggtgg accgggtgat gtggatgtcc
900

agccagaacc tgaagtcggc ggagatccag ctcgaccccc ccgagctggg acgcctggac
960

gtgcgcatcc acatgaccgc cgaccagacc caggtgacct tcgccagtcc caacgccggc
1020

gttcgcgacg ccctggaaag ccagatgcac cggctgcgcg acatgttcag ccagcagggc
1080

atgaaccagc tcgacgtgaa cgtctccgac cagtcgctgg cgcggggctg gcagggccag
1140

cagcagggcg agggcggatc ggcgcgcgga cgcggcttgg ccggcgaggc ctcgggcat
1200

gaggaaaccc tcgccggagt cagcgagatc cgcagccggc cgggtgcgtc ggcggcgcg
1260

ggtctggtcg actactacgc ctga
1284

<210> 6

<211> 2124

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 6

gtggatcgca cgcaactgat cagcaatgtg cgcagcaacc tggcgggact ggggcgcggc
60

agcctcggcg tgcggtcct gctgctggcc atgctggcga tgatgaccct gccgatcccg
120

ccattcctgc tggacgtgct gttcaccttc aacatcgccc tgtccatcgt cgtcctgctg
180

gtctgcgtgt acgccctgcg gccgctggac ttcgccgtgt tcccgaccat cctgctgggtg
240

gcgaccctgt tgcgcctggc gctgaacgtt gcctcgaccc gcgtgggtgt gctccacggc
300

cacgacggcc atggcgccgc aggcaagggt atccaggcct tcggcgaagt ggtgatcggc
360

ggcaactacg tggtcgggggt ggtgggtgttc gcgatcctca tgatcatcaa cttcgtgggtg
420

gtgaccaagg gcgcggggcg gatttccgaa gtcagcgcg cgttcaccct ggatgccatg
480

cccggcaagc agatggccat cgacgccgac ctcaacgcgc gcctgatcga gcaggaggaa
540

gccaagaagc gccgcagcga ggtggcccag gaggccgact tctacgggttc gatggacggt
600

gccagcaagt tcgtccgcgg cgacgccatc gccggcctgc tgattctctt catcaacctg
660

atcggcggcg tcgccatcgg catgatccag cattcgatgt ccttcggcga tgccggcaag
720

gtctacgccc tgctgaccat cggtgacggc ctggtggcac aactgcgcgc gctgctgctg
780

tcgaccgcgg cggcgatcat ggtgacgcgg gtctccagtt ccgaggacat gggccagcag
840

gtcaaccggc agatgttcgc ctgcoccaaag gcgctggcga tttccgcggc gatcctgac
900

gccatgggcg ccgtgccggg catgccgcac gtttccttca tcggcctcgg cgccttgcc
960

ggcgctgccg cctactggat ctggcaccgg cagaacaagg ccaagcaggt cgccgagcag
1020

gaggtgcagc gccagcagga gctgctgccg gcgcagcgcg cccaggaggt caaggaactg
1080

ggttgggacg acgtcacccc ggtggacatg gtcggcctgg aagtcggcta ccggctgac
1140

ccgctggtcg accgcaacca gggcgggcaa ctgctggcgc ggatcaaggc cgtacgcaag
1200

aagctgtccc aggagctggg cttcctgatg ccctcggcgc acatccgcga caacctcgac
1260

ctgctgcccc acgcctaccg tctgaccctg atgggggtca gcgtggccga agcggagatc
1320

tatcccgatc gcgagctggc gatcaacccc ggccaggatc tcggcagcct caacggcatc
1380

gccggcaagg acccggcctt cggcctggag gcggtatgga tcgagcccgg ccagcgcgac
1440

caggcgcagt cgctgggcta caccgtggtg gatgcgagca cagtggcgc cactcacctg
1500

aatcaggtgc tgcacaagca cgcccacgag ctgctgggcc atgaagaagt gcaacagctc
1560

ctgcaattgc tcgcgcgcag ctgcgccgaag ctggcggaag agctggtgcc ggggctgatt
1620

tccctgtcca cctgtctcaa ggtcctgcag gcgctgctcc aggagcaggt gccggtgcgc
1680

gacatccgta ccatcgccga ggccatcgcc aacgtcgctc cacggagtca agatcccggc
1740

gcgatggcgc ccgcgggttcg cgtcgcgttg tcccgcgcaa tcgtgcaaag cattgtcggg
1800

cttgagccgg agctgcctgt gatcacgctc gagccgaggt tggaacagat tttgctgaac
1860

agcatgcaga aggcgggaca aggctccgag gacggcatgt tgctggagcc ggggatggcc
1920

gagaagctgc aacgctcgct gatcgagagc gcgcaacgcc aggagatgct cggtaagccg
1980

gcgatcctgc tggttgccgg accgatccgc tcgatgatgt cgcgcttcgc gcggatggcg
2040

gtgcccagca tgcattgtgt ggctaccag gaaatcccgg acaacaagca agtcaccatc
2100

gtcgcgacgg tgggacagaa ctga

2124

<210> 7

<211> 1146

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 7

atggacatgt ttgccttggg gttggtggtc aatcccctgg ccgggctggg tggcccggtc
60

gccttgaagg gtagcgatgg ggtggccgcc gaggccctgg ccagaggcgc cgaaccacgt
120

gcgctggagc gcacccggat agccgtggag tgccctgttg cgctggtcga gaagatcgag
180

ttcctgacct ttcccggggc catgggtggg gagttgctcg agcgcatggg cttccgccat
240

cgcctgctcg gcgagtggca gggagcggtc agcagcgcgg cggatacccg gttggcgatc
300

gagcgtttgc aggaggccgg tgcgcacctg atcctgttcg ccggtgggtga tggcacagca
360

cgggatgttg ccgggggtgg gcgcgagcaa cagccggtgc tcggcattcc ggccgggggtg
420

aagatccact ccgggggtcta tgccatcagt ccgcgcgcgg ccggcggaatt ggccaggcgc
480

ctggctgagg gcggcctggg gcgcctggcc agcggcgagg tgcgcgacct cgacgaagag
540

gcgctgcgcg ccggccgcgt cgcgcgcgt tggtagggcg agatgacagt gccggaggag
600

ggccacttca tgcagcacgt gaagcaggca gggatggagt ccgaggagct ggtgctgggtg
660

gacctgcgcg actggctggc ggaaaactgg gaagacggcg tgcgctatgt gctcggaccg
720

ggctcgacct tgcattggct ggcgcgcaac ctcggcctgg aaaccaccct gctgggctgc
780

gacgtgctgg agaattggcg ggtgattgcc cgcgacgtcg acgaggcgcg gctgttcgaa
840

ctgggtggacg gtcattccggc gtacctgctg gtcaccgcca tcggcgggcca gggccacgtg

900

atcgggtcgcg gcaaccagca gatcagtccc cgggtgttgc gcgccatcgg cctggagcgc
960

atgcgggtgg tcgccaccaa gcgcaagctg gggaccctcg ggggccgccc gttgctggtc
1020

gacagcggcg acccgggtgct ggacgacagc ttcccggaca ccatccgggt ctgggccggc
1080

tacaaggaag aactgctgta tccgctggga tacgcaagg accaggacgc gcccgcgggc
1140

gcttag
1146

<210> 8
<211> 1695
<212> DNA
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 8
atggcgaggc cctctgagca gcagcaggag gccctggccg ggttactcgg cctgggcagc
60

cactccgcgc gcaagagcca ctacccgag ctgctggcgc gcctggagga gctggaggcc
120

gagcgcaacc gctacaaatg gctgttcgag cacgcggtgc acggcatctt ccaggccagc
180

ctcgcccagg ggctgcgcgc cgccaatccg gcgctggcgc agatgctcgg ctacgacgat
240

cgcgaacagg tgctctggtc gctggaggac atggccgggc aactgttcgt cggcggcgag
300

gccgagatgc gacggatccg cgcgctgctg cgcgagcgcg gcggcctggt cggctacgag
360

acgcgcctct ggcgcagggc cggcagtcac atcgaggtat tgatgaacct gctgctcagg
420

cacgacgagg aagaattggt cgaaggtttc gtcgccgaca tcaccgagcg ggtccaggcc
480

cagcagcgcc tgcagaccat gaacgaggag ctggagcggc gggtagccga gcgcacccac
540

gagctggaag agctcaaccg ccagttgcgc caggcgcgcg acgccgccga agccgccaac

600

cacagcaagg acaagtacct cgcgcgcgcc agccacgacc tgctgcaacc gctcaacgcg
660

gcgcggctgc tggtcgacac cctgcgcgaa cggggcctgc cggccgccga actgcaactg
720

gtggagcgca cccacctggc cctggaaggc gccgagacct tgctcaccga cctgctggaa
780

atcgcccggc tcgaccagag cgcgatccgt ccggacctgg acgactattc cctcgacgaa
840

ctgctcgctc cgctggcctc ggagttcgag gaagtcgcgc gtgccgccgg cctggccctg
900

cgtgcgcgga tcccgcgact agcagtgcgc accgacgcgc gcctgctgtc gcggatcctg
960

cgcaacttgc tcagcaacgc ctgccgtac accgagcgcg gcagcgtgct gctggggggcg
1020

cgcggcgctg gcggcaaggt acgcctggag gtgtgggaca ctggccgggg catccccgcc
1080

gaccagttgc aggcgatctt cctcgagttc aaccaactgg acgccggggcg cgcttcgag
1140

cgccgtggcg tcggactcgg gctggccatc gtcgaccgta tcgccggcat cctcggctac
1200

cgcacgagg tgcattcgac tccaggccga ggctcgctgt tcgccatcga ggtgccgctg
1260

gtccgcaagc cggcgcggcc agcacctggc gaggcgattg cgcgggtttc ggctggtgat
1320

ccgctgccgg gacggcggct gctggtggtg gacaacgaga ccgagattct ctacagcatg
1380

tccgcgctgc tcggccagtg gggctgcgag gtgcttaccg ccaccgacct ggaaggcgcg
1440

cgcaaggcgc tcgatggccg cgcgccggat gcgacacctg tcgactacca cctggaccac
1500

ggcgctaccg gttgccagtt gctgggcgcc ttgcgcgagg actacggcgc ggagatcgcc
1560

gcggtgatga tcaccgccga ccgcagcgac gattgccgcc gcgcgctggc ccgcctgggc
1620

gtgccgctgc tcaacaagcc gctgaagccc ggcaagctgc gcgcggccct gagcgccttg
1680

ctcggcgagc tctag
1695

<210> 9
<211> 807
<212> DNA
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 9
gtggatatcg cattgcacgg cggcgccctgg cacgagtcac tgggaaagtt gctcgaagcg
60

ctggaccggc cgttcttctg gcggatcctg gcgcagaccc tcggccagtt cgcccccgtc
120

gacaactggg cggccctgat attcagcgat tccagtcctt tgattctttc cttcatggag
180

gaggagagag aagaagtcga gccggacccg ctgatcagtc gatataatac cggactttat
240

ctgcaagatc ctttctacca ggtatccagg aactgtcggc gcggcgggct ttttcatctt
300

gcggatatcg tctccgaaga ttctgaaacg accgaatatt acaatacgtc ctttgcgcat
360

tatgtggtga cggacgaagt tcaatataac gtcccgcctgg atggtgaaag aaccctatgc
420

ctgtcggttg gcagcgagag ccgcttcggt gccgagcaga tcgcgctggt cgagctgctt
480

cgcccggtgg tcatcgcgct gatgaaaaaa cgcattccact tcgaggatgc ggtcagggag
540

gaggcgaaac cgatcgagc gccggaggtg gaagtccagc cctggagagg gttgatatcg
600

ccgctgaccg cgcgggagtc ggatgtcatc cggctgatgc tggatggata ctgcaacaag
660

gaaatagcgg atcggctgac gctgtcgatc gccactatca aggtgcatcg ccggcacatc
720

tacgcgaagc tgaacgtgaa gtcccactcc gagatattcg cgctgttgat caaccgcccc
780

gcgccgcggc tcgccgacgc acgctag
807

<210> 10
<211> 2139
<212> DNA
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 10
atgcgcgagc aagccctacg catcctcaaa gacgttttcg gttacgacgc cttccgtggc
60

aaccaggcac ggatcatcga gcgggtagcc gaggggtggcg atgcgctggt actgatgccc
120

accggcggtg gcaagtcctt gtgtttccag gtcccggcgc tgctgcgcga aggctgacg
180

gtggtggtgt cgccgctgat cgcgctgatg gaggaccagg tcgccaccct ggacgaactc
240

ggcgtgccgg cgggtggcgt gaactccacc ctcaaccccg agcagcagcg ggacatcgcc
300

gagcgctgc agcgtggcga gatcaagctg ctctacctgg caccggaacg gttggtccag
360

ccgcgcacgc tggccttcct gcaacgactg ccggtcggcc tgttcgccat cgacgaagcg
420

cactgcgtgt cgcaatgggg ccatgacttc cgtcccgaat acctgcagct cggccagctt
480

gccgagctgt tcccgcaggt gccgcggatc gccctgaccg ccaccgcgga catgcgtacc
540

cgcgaggaga tgatccagcg cctgcacctg cagaacgccg agcagttcct ctccagcttc
600

gaccggccga acatcttcta ccgcatcgtg cccaaggagc agccgcgcaa gcagttgctc
660

ggcttcctct ccgagcggcg cggcgatgcc ggcacgtctt actgcctgtc gcggaagaag
720

gtcgaggagg tcgcggaatt cctcggcaac cagggttcc ccgcgctgcc gtatcacgcc
780

ggactgtcca acgaactgcg tgcccaccac cagaagcgct tcctcaacga ggaaggcttg
840

atcatggtgg cgaccatcgc cttcggcatg ggcatcgaca agcccaacgt gcgtttcgtc
900

gccacactcg acctgcccaa gagcctcgag gcctattacc aggaaaccgg ccgcgccggc
960

cgcatggcc tgccggccga cgctggatg gcctacggcc tgcaggacgt cctgctgctg
1020

cggcagatga tgcagagttc cgagggcgac gagcggcaca agcgcgtcga gcggcacaag
1080

ctggaagcca tgctggcgct ctgcgaggaa acccgttgcc ggcgccaggc gctgctggcc
1140

tatttcgacg aggagatgcc gcagccctgc gggcattgcg acaactgcgt ggacggcgctg
1200

gaaacctggg atgccaccga atccgcgcgc caggcgtctg cggcgatcta ccgcagcggc
1260

cagcgctacg gcgtcggcca tctggtgat atcctgctcg gccgcgagac cgagaagatc
1320

cgcagtctcg gccaccagca cctggcggtg ttcgggatcg gcaaggggcg cggcgaagac
1380

gagtggcgga ccctgttccg ccagttggtc gcgcgcggcc tggccgacgt cgacctggac
1440

ggcttcggcg gcctgcgcct gaccgaggcc tgcgtccgc tgctgcgggg cgaggtgcgg
1500

ctggagctgc gccgcgacct caaaccacag cgcgccaagg gtcctccag cggcggcgcc
1560

agcgccgcca gccaatgggt gcgcagcgaa gagcgggaaa tgtgggaggc cctgcgcgcg
1620

ctgcggcgca agctggccga agagcattcg gtgcgcacct atgtgatctt ccccgacgcg
1680

acctgctgg aatgctccg cagccagccg cgctcgctat ccgacatggc ccaggtcagc
1740

ggggtcggcg cgcgcaagct ggagcgctac ggccaggcct tctcgatgt cctcaccgac
1800

tcgccggcg cgcccgccgc gccgcgcgag gacctgcgcc acgaattggc cagcctggcc
1860

tgtgcgggga tgaccccggc gcagatagcc cgccagctca attgcagcga gaagaacgtc
1920

tacgcgatgc tcgccgaggc catcgccggt cagcaggtga gcctggagca ggcgctggat
1980

ctgcccagagg aactcctcgg cgaaatccag gacgccttcc tcgaggaaga cggcgaactg
2040

ccgccggtgg cggcgctgga ggagcgtttc ggcaagcggg tgccgagtgg cgtgctgcac
2100

tgcgtgcgcg ccgccctgca ggtggaactg gagtcgtga
2139

<210> 11

<211> 2832

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 11

atgtccaacc gtgatatatc ccggcgcgcc tttctccagg gcgggttgat cgccggcgtg
60

ggtgtcacc cggcgccgct cggcagccag gcgttcgctg ccttgttcga gaaccagggtg
120

accgtttccg ccagcgctg gatggcgggc aacggtcagg tccgtttccg taacgacgcc
180

ttgtccaagg tctgcggcaa caaggtgttc gcccgcgata tccgcgccag ggacatgccc
240

ggctggccgc agcagcaagg ccacgccatg ttgctgaaga ccgttcgcgc cgaccgcac
300

taagaaggcc acgaccttcc ctggctgggc gccgagttgc agccggaccg tatcgtcacc
360

gccgccgacc tggagaagga cggcatcgtc ttccccgagg cgcattcgcc cgatccgctc
420

ctgccgcggg gcaaggtgcc gatgttcacg ggccatccgg tggcgatcct gatctggaac
480

gacttcgagc gcttccgccg ggccaagctc aagctcaagt tcaacgacaa ggcgatccgc
540

tatggcgccc aggccccgct gtaccagggc gatccctacg gcagctatcg cttcgtccgg
600

gtcggcggca agacgcccta cgaggacgac gagttctcca gcctgaagga ctcgatgctg
660

ttccccacca tcctcaaccg caaaccggta tggaccgcg agccgaagct gcacggcgac
720

ctcaccgagc aggggctgtt ccatgccaaag cgcattggccg agcaactgga aaacccgcgc
780

caggactggc tggctcttga cgagcgctac aagaccccat cgatcgagcc ggcggcattg
840

gagccggaca acggcaaccg ctggtacgac gcggcgagca agaccttgca cttcgtggtc
900

gccacccagt gcccgttcga agtcgcctac gaaagcgtgc acatgatcaa gccgtcgcgc
960

ttcgccctgg agaagctcaa catccatccg ggctataccg tcggctacgg ctccaaggac
1020

aacaacatct tcgtcttcta tgccgcgctc gccgcgctgt atggcgaggg tgtgccgggtg
1080

cgcctggcca acgaccgcta cgagcagttc cagagcggca tcaagcgcca cccgttcgac
1140

atccgctacc aactggcggt agacaggaac gacctcggct tccgcattct ccgcgccgac
1200

atgagcgccg acggcggcgg gcgcgccaac tacagcgctt cggtgggcggc ggtgggcgcc
1260

accgccgcgc agtcgatcta ctacatgccg cagaacgacc tggcggtcac cgcctatcat
1320

tcgcgcggcg tggaggccgg ctcgatgcgc ggctacggta ccctgcagac catggccgcg
1380

accgagatga tggtcgacga gatcgctggc cggctgggcg tcgacgccat cgacctgcgt
1440

cgtcgcaacg ccctgcgctc gggcatgaag aacacccagg gcgcgggtccc ggccggtgcc
1500

ctgcgcctgc acgagatcct cgacaaggcc gctgcccacg aggtctggaa ggaccgcgac
1560

gcacgcaaga agcgcttcga cgcggaagac ccggacaact ggtatggggg cggcttcgcc
1620

atttgccaga aggacttcgg caccggcgcc gaggcgccga tggcgagcat cgagttcagc

1680
gccgacgggc gcatcagcct gcgccacatc ggcaccgaga tcggtaccgg gatgtccacc
1740
tcgcaggcct tcgtggtcgg cgacttcctc ggccgtccgg cggacgaggt gaagaccgcc
1800
gagaccgaat ggcccagagct gcggctcacc accaagggca atccctacct gatgagccag
1860
gccgagcagg acgccgcgct acgcgatccg cgctgggtcg gcaagctggc ctgccgctcg
1920
tcggcgacca actcggcggt ctatttcagc cacgccaccc gcgaagccgc gcgcgtgctg
1980
ttcaaccacg gcctgtggcc ggcggccctg gagctgtggc gcagcgggtcc gttcggcggc
2040
caggccaatc cctatgtggt gcgccgcgaa aacgcggtat gggtcgacgg ccagttgacc
2100
ggcaacggcc tggcgccgat tcccttcgcc gagctggcga agaaggccca cgagatgggc
2160
ctggtcaccg gcgtcagcgt ccacggcttc aaccgctgga gctgggccga ggccgacttc
2220
gtcatcgatg gcgtgcgcga gcgcctgccg ctcgacgcca tggcggtgaa gtacggcgac
2280
ggcgcgccgg gagtgaagaa ggcgatgatg aacagcgccg gcttccacct gctcgaccgg
2340
cagaatccgg ctatccggc gaccagctg aacaacgcga tggtcaccta ctacagtccg
2400
gtggcgaccc tggtcgagct gaaggtgaac aagggcagcg gcgaggtgca ggtgctcgac
2460
caccattcct ggatcgagtg cggccgggtg ctggtgccgg agctggtcaa gggccagctg
2520
gagggcgga tcgccatggg tatcgcccat gcgctgctgg aggaaatgcc gctctacgag
2580
ggcgggcccc cggaagggga ctggaacttc aaccgctacc ggttgccgcg ggcgaaggac
2640
gtggcggtgt ggagccagac ggcgagatc ctcccgccgc tgcgccgac cgaccgggcc
2700

aagggcatcg ccgaggtggt gatgatcccg gtggtcggcg ccatcgccaa cgccgtggcg
2760

cacgccaccg gcaagcgcggt ccgcgacctg cccatcactc ccgcccgcgt caaggaggcc
2820

ctccatgggt aa
2832

<210> 12

<211> 2145

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 12

atgaacagtg gcctctcgcg cctcgggata gctttgctgg ccgccatgtt cgcgccggca
60

ttgctcgccg cggacctgga gaaactcgac gtggcggcac tgccctggcg cggggtcgag
120

ctaaagctgc agttcgacga gcccgtcgcc gcgccgcgtg gctataccat cgagcagccg
180

gcgcgaatcg ccctcgatct gccgggggtg cagaacaagc tcggcaccaa gaatcgcgag
240

ctgagcgtgg gcaatacgcg cagcgtcacg gtggtcgagg cgaaggatcg cacacggttg
300

atcatcaacc tgaccgcgt gtcgtcctac accacccggg tggaaggcaa caacctcttc
360

gtggtggteg gcaattcgcc ggccggcgcc agcgtcgctt ccgccgctcc ggtcaaggca
420

agcccggttc cggccagcta tgcccagccg atcaagccca agccgtacgt gccggcgggt
480

cgtgccatcc gcaacatcga tttccagcgt ggcgaaaagg gcgagggcaa cgtggtcac
540

gacctgtccg acccgacctt gagcccggat atccaggagc agggcggcaa gatccgcctg
600

gacttcgcca agaccagct gccggatgcg ctgcgggttc gcctggacgt caaggacttc
660

gccacgccgg tgcagttcgt caacgccagc gcgcaatccg accgtaccag catcaccatc
720

gagccgagcg ggctctacga ctacctggtc taccagaccg acaatcgcct gaccgtcagc
780

atcaagccga tgaccacgga agatgccgag cggcgcaaga aggacaattt cgcctatacc
840

ggcgagaaac tgtcgctgaa cttccaggac atcgacgtgc gttcgggtact gcaactgac
900

gccgacttca ccgacctgaa tctggtggcc tcggataccg tgcagggcaa tatcacctg
960

cgctgcaga acgtgccgtg ggaccaggcg ctggacctgg tactgaagac caagggcctg
1020

gacaagcgca agctcggcaa cgtactgctg gtggccccgg ccgacgagat cgcgcgccgt
1080

gagcgccagg agctggaagc gcagaagcag atcgccgagt tggcgccact ggcgcgggaa
1140

ctgatccagg tgaactacgc caaggccgcg gacatcgcca agctgttcca gtcggtgacc
1200

agcgatggtg gccaggaagg caaggaaggc gggcgcggtc cgatcacctg cgacgaccgc
1260

accaacagca tcatcgcta tcagccccag gagcgactgg acgaactgcg gcggatcggt
1320

tcgcagctgg atattccggt gcgccagggt atgatcgagg cacgcatcgt cgaggccaac
1380

gtcggttacg acaagagtct cgggtgtgcg tggggcggcg cttatcaciaa gggcaactgg
1440

agcggctacg gcaaggacgg caatatcggg atcaaggacg aggacggcat gaactgcggc
1500

ccgatcgccg gtagctgtac cttcccgaac acgggtacca gcaagtcgcc gtcgccgttc
1560

gtcgacctcg gtgccaagga tgctacctcc gggatcgga tcggcttcat caccgacaac
1620

atcatcctcg acctgcaact gtcggcgatg gaaaagaccg gcaacggcga gatcgtctcc
1680

caacccaagg tcgtgacctc ggacaaggaa accgcgaaga tcctcaaggg ctcggaagtc
1740

ccctaccagg aggccagttc cagcggcgct accagcacct cgttcaagga agccgcgctg
1800

tccctcgagg tgaccccgca gatcaccocg gacaaccgga tcatcgtcga agtcaagggtg
1860

accaaggacg cgccggatta ccagaatatg ttgaacggcg tacctcctat caacaagaac
1920

gaggtcaacg ccaagatcct ggtcaacgac ggcgagacca tcgtcatcgg cggcgtgttc
1980

agtaacgagc agagcaagtc ggtggagaag gtgccgttcc tcggcgaact gccttacctg
2040

gggcggctgt tccggcgtag taccgtcacc gaccggaaaa acgaacttct ggttttcctg
2100

acaccgcgga tcatgaataa tcaggccatc gcaatcggtc gctga
2145

<210> 13

<211> 1155

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 13

atgagcgagc gtgcgcccct ggtaatcatc ggaaccggcc tggcgggcta caacctggcc
60

cgcgagtggc gcaagctgga cggcgagacg ccgctgctga tgatcaccgc cgacgacggc
120

cgttcctatt ccaagccgat gctctctacc ggcttctcga agaacaagga cgccgacggc
180

ctggccatgg ccgaaccggg cgccatggcc gagcaactga acgcgcgcat cctgacccat
240

acccgggtca ccggtatcga tcccggccat cagcggatct ggatcggcga ggaagagggtg
300

cgttatcgcg acctggctct ggccctggggc gcggagccga tccgggtgcc ggtcgagggc
360

gatgcccagg acgcgctcta cccgatcaac gacctggaag actacgcgcg cttccgccag
420

gcggctgccg gcaagcgccg ggtactgctg ctcggtgcgg ggctgatcgg ttgcgaattc
480

gccaacgacc tctccagcgg cggctaccag ctcgacgtgg tggcgccctg cgagcaggtc
540

atgccgggcc tgctccaccc ggccgcggcg aaggccgtgc aggcaggcct ggaaggcctc
600

ggcgtgcgct tccacctggg gccggtgctg gccagcctga agaaggccgg cgaggggctg
660

gaagcgcata tttcggatgg cgaggtgatt ccctgcgacc tggtaggtctc cgccgtcggc
720

ctgcgtccgc gcaccgaact ggccttcgcc gccgggctgg cggtaaaccc cgggatcgtc
780

gtcgaccgct cgctgcgcac ctcccacgcc aacatctacg cgctgggcca ctgcgccgaa
840

gtggacggcc tcaacctgct ctatgtgatg ccgctgatgg cctgcgcacg cgccctggcg
900

cagaccctcg ccggcaaccc cagccaggcg gcctacggtc ccatgccggt gacgggtgaag
960

accccgccct gcccgctggt ggtgtcgccg ccgccccgcg gaatggatgg ccaatggcta
1020

gtggaaggct ctggaacgga cctcaaggtc ctgtgtcggg ataccgctgg tcgagtgate
1080

ggttatgccc tgaccggagc ggcggtgaac gaaaaattgg cctgaacaa agagttaccc
1140

ggcctcatgg cttga
1155

<210> 14

<211> 1254

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 14

atgttcagca agcatgacca gatccgcggc tacgacgacg aactgctcgc cgcgatggac
60

gccgaagagg cccgccagga agaccatctc gaactgatcg cctcggagaa ctacaccagc
120

aagcgggtca tgcaggcgca gggcagcggc ctgaccaaca agtatgccga gggctatccg
180

ggcaagcgct actacggcgg ctgcgaacac gtcgacaagg tcgagcggct ggccatcgac
240

cgcgccaggc aactgttcgg cgccgactac gccaacgtcc agccgcactc cggttcctcg
300

gccaacgctg cggtgtacct ggcgctgctc aacgccggcg acaccatcct cggcatgagc
360

ctggcccacg gcggccatct caccacggc gccaagggtgt cctcctccgg caagctttac
420

aacgccgtgc agtacggcct ggacaccgct accgggctga tcgactacga cgaagtcgag
480

cgcctggccg tggagcataa gccgaagatg atcgtcgccg gcttctccgc ctactccaag
540

accctcgact tcccgcgctt ccgcgccatc gccgacaagg tcggcgcgct gctgttcgctc
600

gacatggccc acgtcgccgg gctggtcgcc gccggcctct acccgaaccc gatccccctc
660

gccgacgtgg tcaccaccac caccacaag accctgcgcg gcccgcgcgg cggcctgac
720

ctggcgcgcg ccaacgagga gatcgagaag aagctcaact ccgcggtatt tcccggcgcc
780

cagggcgggc cgctgatgca cgtgatcgcg gccaaaggcg tgtgcttcaa ggaagcgctg
840

gagccgggct tcaaggacta ccaggcgag gtgatccgca acgccaaggc gatggccgag
900

gtgttcacgc ggcgcggtta cgacgtggtt tccggtggca ccgacaacca cctgatgctg
960

atcagcctgg tgcgccaggg cctgaccggc aaggaagccg acgccgccct cggccgggtc
1020

ggcatcacgg tgaacaagaa cgccgtgccg aacgatccgc agagcccgtt cgtcacctcc
1080

ggcatccgca tcggcacccc ggccatcacc acccgcgggc tgcaggaagc gcagagccgc
1140

gaactggccg gctggatctg cgacatcctc gaccacctcg gcgatgccga cgtggaggcc
1200

aaggtcgcca ccaggtcgc cggtctctgc gcggacttcc cggctctatcg ctga

1254

<210> 15

<211> 500

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 15

ctgcagggct acgctgaggg agttgtagag gaggccgatg acaacaccct gcgcatccgg
60

ctagcccatg gccttcgagt caaagaagcg tctcccgcgc ccgatgacgt ggccgacgtt
120

ccgcgtacgc cgggggttaa gaagccttcg atacgtctgc tcgggctgct ccagctgctg
180

tggttagagg ctggactggc caactggtac cactgatgg aaggcaagcg aacgcccgcg
240

aatgttgctt attgggtatc tgaagccgca aagcgtatcc gggccagccg aatgacggtg
300

ttcgacgtct tgctgatgtc ggccaagaag aactcccgcg tggcgaagcg caatgctgag
360

gtcgtggagc tggcgcagga gcattcgcg aggctcattg cgggtgcgcc gctggcgctc
420

ttcaactcgg aacgacgcaa tctcttgacg ctttctgtct cgggaccott cgggatgccg
480

acgatggaca ttcgagcgga
500

<210> 16

<211> 763

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 16

tgcaggatct gggtcagggtt gtcgatcagg ttctgggtca gcgaattcag agctctcatt
60

cgtcctggca ctccactgcc ggttgggtctg ggaaattaat tgggaagggc ggcaggccgc
120

gcgccttgct gagatccgct gcgacctgca aggccgcctc gagctcgctg cagccgggtg
180

cttgcacgat gttgtagcgc tggttctttt cttcgttttc ggtcatggcc agggccaggt
240

agagactcgg gggaaccaca cggaagaggt actccttgcc cttggccagg agcacgccct
300

cgggtgaattt gccgctttcc ttgcggggccg agagcatcat cgacttctgc gccggcgaca
360

gctcgcgga cctggagatc ttctctacct cgtctggggg catgttcagg cacaaccacc
420

actcgatcat gttcagcatc ggcgccccgg aggctgggat gtcgtcgatg ttctgggtgg
480

cgagccagaa ccaggcgccc agtttccgcc acatcttggt gatcttcacg gcgtagggca
540

gcagcagcgg gtgcttggtg atgatgtgtc cctcatcggg gatcttgacg atgggccggc
600

ccttgaattg gtcgcgttcg gcgatgttgt ttacgggtgtt cagcagcgag atgtaggcga
660

tcccagactg ggcggcgtag ccttcgcgcg cgtaagtcgc gaaatccacc acggtgaggt
720

cggcttcagg ccagggcgtg cctttgcgat tgaacatctc gcc
763

<210> 17

<211> 2910

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 17

atgcgttgga aactccctg gccgaagctg gccgcaccga agctggccgc gtccggcgct
60

ggcgatgacg agcagccgga cggctggcag cgccacgtcg aggcactgca ccaggccggc
120

atccccgaac ccggcacggc ggtgcaaggt cacaggccgg cgaccatggc agacgagcag
180

acgctgtatg aggtcgcgcc gtcgttcgtg gaactactgc cctgggtgga gttcctgccg
240

cagtcgaagg ccatgttgct ggaggacggg caatcgggtg cggcctttta cgagctggtg
300

ccgctgggca ccgaaggccg ggaacccggc tggctcgcg aggcccgca tgccttggag
360

aacgcgctgc aggacagttt cgatgaactg gacgaaactc cctgggtggt gcagctctac
420

gcccaggacg agcccagttt tgaccagtac atgcagacc tgccgcgacta tgtgcagccg
480

cgcgcccgtg atacagcggt cagcgagttc tacctgcgct tcttcggcca ccacctgcgc
540

gcggtggcca agccgggchg cctgttcgag gacactgtgg tcacacggct gcgctggcgc
600

ggccagacc ggcgcgctgc catggtggtc taccgccgch tgaccgggca agggcaaac
660

agccgtcgch ggcagacgch cgagcagatg ctcaatatcg tctgcgacc cctgtgcgch
720

ggactggcga acgccggcat tcaggccchg cgcattggtc chgcagatgt tcatgactgg
780

ttgctcgct ggttcaaccc gcgccccach ttgctcgggc ctggggccga agaccgggag
840

cgtttctata cattggcgch ctatcccgac agtgchgagg aaggcgagga chgcgagatc
900

gagctggcga gcggacggga tttcagccaa chgctgttct tcggccagch gcgttccgac
960

gtggcgcacg gcacctggca tttcgacgch atgccgacc gcgtgctgat caccgaccgch
1020

ctgcgcatgc chccaggcac gggacacctg accggcgaga chcgcaaggg chacgccatc
1080

aacacgttgt tcgaccagat gcccgaggac accatccttt gcctgacgct ggtcgccach
1140

ccgcaggatg ttctcgaagc ggatctcaat catctggcga agaaggccgt gggcgaaacc
1200

ctggcatccg agcagacgct caaggacgtg catgaagccc gctccctgat chgcagcgch
1260

cacaagctct atcgtggcac gctggcgctt tacctgcgch ggcgcgacga ggcggaactg
1320

gatcggcgch gcctcgacct ggcgaacgct atgctcaac chggtttgca gccggttcgch

1380

gaagacgacg aggtggcacc gctgaacagc tacttgcgct ggctgccgtg ctgctacaac
1440

cccggccagg atcggcgcaa gtggtacacc caactgatgt tcgcccagca cgcggcgaac
1500

ctctcgcgcc tgtggggccg cgcccaaggt acggggcacc ccggcatcac gatgttcaac
1560

cgcggcggcg ggccgatcac cttcgaccgc ctcaaccgcc tggatcggca gatgaatgcc
1620

cacctgtttc tgttcggccc gacaggttca ggcaagtcgg cgaccctcaa caacctcttg
1680

aatcagggtca cggcgatcta ccgtccccgc ctgttcattg tcgaggccgg caacagcttc
1740

ggcttggtca gcgactttgc ccggcgccctg ggcccgaccg tgaatcgggt caagctcgct
1800

ccgggctcgg gcgttaccct ggcgccgttc gcggatgcgc gccggctgat cgagacgccc
1860

agcgacgtgc agacgctcga cgccgatgcg ctggatgaag acctgcctcc cgatgctgtg
1920

gccatggagg cagatgagca gcgcgacgta ctgggtgaac tggagatcac cgcgaggctg
1980

atgatcaccg gcggcgaaga taaagaagaa gcccggatga cgcgagccga ccgctcactg
2040

atccgtcagt gcattctcga tgccgccgag cactgccaca gcaaggatgg cgagaagcga
2100

accgtttctca cgcgcgatgt gcgcaacgcg ctgcgcacgc gcagccagga cccgacgctg
2160

ccggaaatgc ggcgtgtgcg actgctggag atggccgacg ccatggacat gttctgccaa
2220

ggcacggacg gcgaaatgtt cgaccgcgac ggttcgccgt ggcccgaagc cgacatcacc
2280

ctggtggatc tggcgacctg tgcccgcgaa ggctacaacg cgcagctctc tattgcctac
2340

atcagcctga tcagcacggt gaacaacatt gccgagcgcg atcagtacct gggccgccccg
2400

atcatcaacg tcaccgacga aggacacatc atcaccaaga acccgctgct cgcaccctac
2460

gtggtgaaga tcaccaagat gtggcgcaag ctgggggcct ggttctggct cgccacacaa
2520

aacatcgacg acttgccgcg cgctgcagag cccatgctca acatgatcga gtggtggatc
2580

tgcctgtcga tgccgcccga tgaggtggag aagatcgcgc ggttccgcga actctcgct
2640

gcgcagaagg cgctgatgct ttccgcgcgc aaggaagccg ggaagttcac cgagggcgtc
2700

atcctctcca agagcctgga agtgctgttt cgggccgtgc caccgagcct ctatctcgcg
2760

ctcgcgcaga cggaaccgga ggagaaggcc gagcgttacc agctcatgca gcaacacggc
2820

atcagcgaac tcgatgcggc cttcaaagtg gccgagagaa tcgaccaggc gcgcggcatc
2880

aagtcgccag ccgtgggcct gccgcaatag
2910